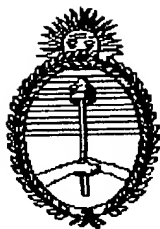


OFICIAL  
DE PARIS  
Boa 1958-

REPUBLICA



ARGENTINA

J1050 U.S. PTO  
09/955259  
09/12/01

*Ministerio de Economía  
y Obras y Servicios Públicos  
Instituto Nacional de la Propiedad Industrial*

## CERTIFICADO DE DEPOSITO

Acta N° P 00 01 04797

El Comisario de la Administración Nacional de Patentes, certifica que con  
a 13 de SEPTIEMBRE de 20 00 se presentó a nombre de LABORTORIOS  
TA S.A. CON DOMICILIO EN BUENOS AIRES. REPÚBLICA ARGENTINA

solicitud de Patente de Invención relativa a CEPA DE LEVADURAS METILOTRÓFICAS RE-  
MBINANTES PRODUCTORAS DE UN PRECURSOR DE INSULINA, CONSTRUCCIONES  
ADN Y MÉTODO PARA OBTENER LA CEPA.

La descripción y dibujos adjuntos son copia fiel de la documentación depositada en el  
Instituto Nacional de la Propiedad Industrial.

certifica que lo anexado a continuación en OCHENTA Y OCHO fojas es copia fiel de los  
registros de la Administración Nacional de Patentes de la República Argentina de los  
documentos de la solicitud de Patentes de Invención precedentemente identificada.

A PEDIDO DEL SOLICITANTE Y DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO EN  
LA CONVENCIÓN DE PARÍS (LISBOA 1958), APROBADO POR LEY 17.011, EXPIDO LA  
SENTE CONSTANCIA DE DEPOSITO EN BUENOS AIRES, REPUBLICA ARGENTINA, a  
OCHO días del mes de AGOSTO de 2001,-

CERTIFIED COPY OF

EDUARDO B. ADIAC



# MEMORIA DESCRIPTIVA

## DE LA

# PATENTE DE INVENCION

REFERIDA A:  
**"CEPA DE LEVADURAS METILOTRÓFICAS RECOMBINANTES  
PRODUCTORAS DE UN PRECURSOR DE INSULINA, CONSTRUCCIONES  
DE ADN Y MÉTODO PARA OBTENER LA CEPA"**

SOLICITADA POR:

**LABORATORIOS BETA S.A.**

DOMICILIADA EN:

**AV. SAN JUAN 2266,  
C1232AAR BUENOS AIRES, ARGENTINA**

POR EL TERMINO DE 20 AÑOS

-----\*

Nieto & Cia.

Carlos Pellegrini 331 - Piso 8° (1009) Buenos Aires - Argentina - Tel. y Fax. 4326-9373 / 4327-3324



**TÍTULO: CEPA DE LEVADURAS METILOTRÓFICAS RECOMBINANTES  
PRODUCTORAS DE UN PRECURSOR DE INSULINA, CONSTRUCCIONES DE  
ADN Y MÉTODO PARA OBTENER LA CEPA**

La presente invención se refiere a una cepa de levaduras metilotróficas recombinantes productoras de un precursor de insulina, construcciones de ADN y método para obtener la cepa. Dicha cepa comprende en su genoma por lo menos una copia de una primera construcción de ADN y una segunda construcción de ADN, donde dichas construcciones son capaces de conducir la expresión y liberación de un precursor de insulina. La presente invención está relacionada con el campo de la tecnología del ADN recombinante y más precisamente con la producción de precursores de insulina en huéspedes como las levaduras.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La insulina es una hormona central del metabolismo y es un fármaco de importancia para el tratamiento de la diabetes. La insulina es una proteína constituida por dos cadenas de polipéptidos. La cadena A está formada por 21 residuos de aminoácidos y la cadena B por 30 residuos de aminoácidos. Las dos cadenas están covalentemente unidas por puentes disulfuro entre A7-B7 y A20-B19, y un puente disulfuro intracatenario que une a los residuos A6 y A11.



La insulina es producida en el páncreas por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans en la forma de preproinsulina. La molécula de preproinsulina consiste en un prepéptido de 24 aminoácidos que actúa como secuencia señal de exportación seguido de un péptido denominado proinsulina que contiene 86 residuos de aminoácidos. Dicha preproinsulina se puede representar como: prepéptido-B-Arg-Arg-C-Lys-Arg-A, en donde el péptido C es un péptido conector que está constituido por 31 residuos de aminoácidos y las cadenas A y B son las cadenas A y B de la proinsulina humana.

Cuando se sintetiza la cadena de pre proinsulina el péptido señal la dirige hacia el interior del retículo endoplasmático de las células  $\beta$ , en ese momento el péptido señal es escindido liberando al interior del retículo la proinsulina.

Posteriormente, durante el empaquetamiento de la molécula de insulina dentro del sistema secretorio de las células  $\beta$ , el péptido C es escindido liberándose la molécula de insulina nativa, adecuadamente plegada. La escisión del péptido C se realiza por la acción de enzimas que actúan sobre las secuencias dibásicas de la proinsulina. Este sistema enzimático es similar al de tripsina/carboxipeptidasa B.



Actualmente se piensa que el péptido C cumpliría una importante función en la formación de la estructura terciaria de la molécula de insulina.

La producción de insulina para el tratamiento de la diabetes es desde hace muchos años una preocupación de la industria farmacéutica.

A partir del desarrollo de las técnicas de ADN recombinante se han publicado una gran variedad de métodos para la producción de insulina en microorganismos.

Los primeros huéspedes empleados en las técnicas de ADN recombinante fueron las bacterias, fundamentalmente *Escherichia coli* (*E. Coli*). En los primeros ensayos que se realizaron con *E. Coli* se adoptaron estrategias semejantes a las empleadas en la producción de insulina sintética. De acuerdo con estos métodos las cadenas A y B se clonaron y se expresaron en el microorganismo huésped de manera independiente, obteniéndose dos polipéptidos que correspondían a las cadenas A y B. La insulina nativa se obtenía posteriormente realizando *in vitro* las etapas de formación de los puentes disulfuro entre las cadenas A y B y el respectivo puente intracatenario. Este proceso de oxidación se realizaba tal cual lo descripto por Chance, R.E. y col. en Diabetes Care 4:147; 1981 y Goeddel, D.V. y col. en Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 106-110, 1979. Una de las mayores dificultades que presentaba este método



era la formación al azar de los puentes disulfuro generando moléculas cuya estructura terciaria era incorrecta. Mediante este método el rendimiento de insulina nativa con actividad biológica era extremadamente bajo, incrementando de manera notoria los costos de producción.

Teniendo en cuenta las dificultades antes mencionadas surge entre los expertos la idea de clonar la secuencia de ADN correspondiente a la proinsulina o derivados de la misma en los que el péptido C está representado por fragmentos de distintos tamaños. Estas ideas se basaron en que la presencia del péptido C o sus fragmentos permitía un mayor rendimiento de proinsulina plegada correctamente luego de la etapa de oxidación que el rendimiento que resultaba de la oxidación de las cadenas A y B por separado (Dteiner D.F. et al. Proc. Acad. Sci. 60:622; 1968.). De este modo se observó que la cadena C que funciona como péptido conector de las cadenas B y A permite que los residuos cisteína se encuentren espacialmente favorecidos para una correcta oxidación. Se demostró que la molécula de proinsulina así formada podía funcionar como un precursor a partir del cual era posible obtener insulina removiendo *in vitro*, mediante enzimas específicas, al péptido C. (Kemmler, W. et al. J. Biol. Chem. 91: 246:6786; 1971). También se demostró que si a estos precursores se



les cambiaba el fragmento C por un péptido ~~correcto~~ de menor tamaño que mantuviese en ambos extremos sitios para ser escindido *in vitro* por la acción de enzimas adecuadas, se obtenían resultados equivalentes y en ciertos casos mejores rendimientos en la producción de insulina. Estos precursores recibieron el nombre de mini - proinsulinas (Wollmer, A. et al. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355:1471-1476; 1974 y Patente EPO 195 691).

La patente Europea 0055945 divulga un procedimiento para producir y expresar en *E coli* a la proinsulina y métodos para producir la insulina humana. La producción a gran escala de la proinsulina en *E coli* se divulga en la patente US N° 5.460.954. En la patente US 4.431.740 se divulga un ADN que tiene una secuencia que codifica para la proinsulina y otro ADN que codifica para la pre proinsulina y un microorganismo como *E. Coli* transformado con dichas secuencias.

Sin embargo, la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* presenta una infinidad de dificultades bien conocidas por los expertos en el arte. A modo de resumen podemos decir que:

Cuando *E. coli* u otro microorganismo procariota es utilizado como huésped para la expresión de proteínas provenientes de eucariotas es incapaz de establecer los



puentes disulfuro adecuados que permitan la correcta formación de la estructura terciaria. Debido a ello cuando proteínas como la insulina humana son clonadas y expresadas en microorganismos, dichas proteínas tienden a agregarse formando complejos inactivos o cuerpos de inclusión.

La solubilización y la purificación de la proinsulina a partir de los cuerpos de inclusión requiere de una gran cantidad de etapas adicionales. Una de dichas etapas comprende la disolución de los agregados con reactivos tales como Urea o Cloruro de Guanidinio. Posteriormente es necesario someter al precursor de insulina a un agente oxidante por medio de una sulfitólisis oxidativa en la que las moléculas de cisteína de ambas cadenas adoptan la forma  $\text{SSO}_3^-$ . Luego se convierten los grupos S-Sulfonados a Sulfhidrilos ( $-\text{SH}-$ ) en presencia de un agente tiolado (ditiotreitól o 2- mercaptoetanol). Finalmente, estos grupos se oxidan en presencia de oxígeno para formar los puentes disulfuro. Los métodos para la recuperación de la proinsulina a partir de los cuerpos de inclusión continúan siendo blanco de intensas investigaciones, intentando mejorar el rendimiento y el correcto plegado de la proteína que la purificación del precursor reduce significativamente y hace excesivamente complejo el esquema de purificación. (Chance, R. Y col. Proceedings of the Seventh American Peptide Chemistry





Symposium páginas 721-728, 1981, Pierce Chemical Company, Rockford, IL.; Chan, S.J. y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (9): 5401-5405, 1981 y Frank, B. H. Y col. Proceedings of the Seventh American Peptide Chemistry Symposium páginas 729-739, 1981, Pierce Chemical Company, Rockford, IL.)

Por otra parte, *E. coli* o cualquier otro organismo procariota comienza la traducción de las proteínas con el aminoácido metionina. Para lograr la eliminación de la metionina del extremo amino terminal se suele clonar al gen de interés como una proteína de fusión. La separación de la insulina del péptido de fusión requiere de un paso adicional que involucra la digestión del péptido con proteasas específicas. De lo contrario el residuo metionina debe ser eliminado con Bromuro de Cianógeno (CNBr). La patente Europea 0 055 945 divulga un método y un vector para escindir un análogo de la proinsulina cuyo péptido C es más pequeño y donde el residuo metionina es eliminado empleando un tratamiento con CNBr.

Otra de las dificultades que presenta la expresión de proteínas heterólogas en los procariotas es la disminución de la estabilidad de la proteína por la acción de proteasas citoplasmáticas. La patente US 5.460.954 divulga un proceso para producir proinsulina humana en *E. Coli* que comprende un vector que contiene una secuencia en el extremo 5' del gen de la proinsulina que codifica para



una secuencia de aminoácidos que evita la degradación por proteasas en el interior de la célula.

Muchos investigadores están intentando mejorar los métodos de producción de proinsulina humana en *E. Coli* para hacer de este un procedimiento más sencillo y de mejor rendimiento. Estos métodos que mejoran el rendimiento de la proteína se realizan reemplazando al péptido C por secuencias más pequeñas (Chang, Seung-Gu y col. *Biochem. J.* 329: 631-635, 1998). También se han desarrollado métodos que permiten la expresión de proinsulina en bacterias combinando diferentes procedimientos como la expresión de una proteína de fusión compuesta por una cola de polihistidina en el extremo N-terminal, un residuo de metionina y la secuencia de la proproteína de la insulina humana, todo incorporado en un vector de expresión para bacterias (Cowley, Darrin J. Y col. *FEBS Letters*, 402: 124-130, 1997)

A partir de las dificultades operativas que significa expresar una proteína humana en un huésped procariota se ha intentado lograr altas expresiones en huéspedes eucariotas como las levaduras. Las levaduras, por lo tanto, se han convertido en uno de los huéspedes de elección para la expresión de proteínas eucarióticas. Estos microorganismos ofrecen claras ventajas respecto de las bacterias en lo referente a la producción de proteínas de



mamíferos. Las levaduras poseen rutas secretorias similares al sistema secretor de los mamíferos y tienen la capacidad de plegar, procesar proteolíticamente, glicosilar y secretar adecuadamente las proteínas de mamíferos.

Cuando en las levaduras se utilizan vectores adecuados para la exportación de la proteína al exterior de la célula, el procedimiento de recuperación y purificación de las proteínas exportadas al medio de cultivo es mas sencillo y poseen mejor rendimiento respecto a la expresión en el citoplasma de la célula. Además, la vía de secreción ofrece un ambiente adecuado para la formación de los puentes disulfuro necesarios para el correcto plegado de las proteínas (Smith, et al. 1985 *Science* 229:1219); mientras que el citoplasma es un ambiente reductor en el cual estas uniones no se producen. Por esta razón las proteínas que necesitan formar puentes disulfuro para mantener una correcta estructura terciaria como es el caso de insulina pueden ser producidas con mejores resultados cuando son secretadas.

Dentro de los sistemas que emplean a las levaduras como huéspedes para la producción de un vasto número de proteínas se encuentran las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. La genética de esta levadura ha sido estudiada en detalle por numerosos grupos de investigación.



12

Diversas polipéptidos como la proinsulina han sido clonados y expresados en *Saccharomyces cerevisiae*. La expresión de este propéptido puede seguir la vía secretoria o acumularse en el citoplasma del microorganismo huésped. En este último caso se deben incluir procedimientos de purificación muy laboriosos que requieren de etapas para la formación de los puentes disulfuro tal como se divulga en la patente Europea N°37255. Para evitar estas complicaciones la secuencia correspondiente al gen de la proinsulina se clona a continuación de una secuencia de ADN adicional denominada líder o péptido señal que da origen al péptido pre proinsulina. Este péptido una vez reconocido y procesado por la levadura permite la secreción de la proinsulina al medio de cultivo.

Por otra parte, los precursores del tipo proinsulina que se producen en *Saccharomyces* sufren un rápido procesamiento enzimático tanto cuando se los expresa en el citoplasma como cuando se secretan al medio. Se ha demostrado que la proinsulina humana es especialmente sensible a cortes enzimáticos en dos secuencias dibásicas (Arg<sub>31</sub> - Arg<sub>32</sub> y Lys<sub>64</sub> - Arg<sub>65</sub>). Esto provoca la partición de la molécula antes de la formación de los puentes disulfuro, resultando en la generación de los péptidos C, A y B por separado.



13

Se encontró que si en lugar de proinsulina se trabaja con secuencias mas cortas en las cuales el péptido C ha sido removido o simplemente está representado por fregmentos más cortos de hasra dos aminoácidos del tipo lisina, arginina se logra una molécula más estable, no digerible por proteasas y capaz de ser procesada *in vitro* originando finalmente una molécula de insulina biológicamente activa (Lars Thim y col. Proc. Natl Acad. Sci. USA 83: 6766-6770, 1986). La patente Europea N° 195.691 divulga diversos precursores, entre ellos los del tipo B-X-Y-A en los que B y A corresponde a las cadenas B y A de insulina humana, y donde X e Y están representados por los aminoácidos lisina o arginina, pudiendo ser estos aminoácidos digeridos con las enzimas tripsina y carboxipeptidasa B para su conversión a insulina humana. Sin embargo, como sub productos de la digestión se producen cantidades considerables de A<sub>0</sub>Arg-desB(30), este subproducto no posee el aminoácido 30 de la cadena B, mientras que le queda una arginina remanente unida a la cadena A. La arginina remanente no puede ser removida fácilmente provocando serios inconvenientes en el proceso de purificación de la proteína y disminuyendo considerablemente los rendimientos de producción. La producción total de este precursor en *S. Cerevisiae* es notoriamente baja.



Por otra parte, la patente US. N° 4.916.212 divulga un precursor de cadena simple de la proinsulina, donde dicho precursor se representa por la formula:  $B_{(1-29)}-(X_n-Y)_m-A_{(1-21)}$ , donde  $X_n$  es una cadena peptídica con  $n$  aminoácidos,  $Y$  es lisina o arginina,  $n$  es un entero entre 0 y 35,  $m$  es 0 ó 1,  $B_{(1-29)}$  es una cadena B a la cual le falta la treonina de la posición 30 y  $A_{(1-21)}$  es la cadena A de la insulina humana. Esta patente divulga que  $-X_n-Y-$  no contiene dos aminoácidos básicos adyacentes como por ejemplo lisina y arginina debido a que la digestión con tripsina genera subproductos difíciles de ser separados en las etapas de purificación. Los productos obtenidos a partir de estos diseños genéticos no contienen el aminoácido treonina en la posición 30 y por lo tanto deben ser sometidos a un etapa extra consistente en la adición de este aminoácido mediante la acción catalítica de la tripsina en presencia del éster Thr-OBu como lo divulga la patente US. N° 4.343.898; y Rose, K. y col. *Biochem. J.* 211: 671-676, 1983).

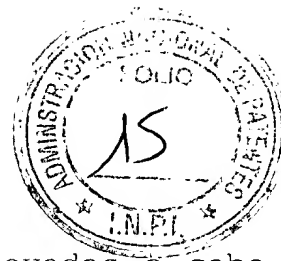
De todas maneras mas allá de las modificaciones introducidas en los precursores de insulina, la expresión de estos péptidos en *Saccharomyces cerevisiae* da como resultado bajos rendimientos y problemas relacionados con el escalado de la producción de proteínas heterólogas. Estos problemas están asociados generalmente a promotores



de baja eficiencia y a que las secuencias de interés se hallan clonadas en plásmidos de replicación autónoma. Estos plásmidos no se mantienen homogéneamente distribuidos en el cultivo y suelen disminuir en el número de copias. Como resultado de ello y luego de algunos ciclos de duplicación se encuentran en el cultivo células con 2, 3 o 0 copias del plásmido utilizado como vector (Chan, S.J. y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78. (9): 5401-5405, 1981).

Un sistema de expresión en levaduras distinto del que emplea a *Saccharomyces* como huésped es el de las levaduras metilotróficas. Estos microorganismos pueden ser muy útiles como huéspedes para la expresión de proteínas heterólogas cuya demanda requiere grandes volúmenes de producción. Las proteínas heterólogas expresadas en las levaduras metilotróficas pueden secretarse al citoplasma con niveles de expresión equivalentes a los de *E. Coli* y superiores respecto de los niveles de expresión de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las levaduras metilotróficas son microorganismos unicelulares capaces de crecer en presencia de metanol como única fuente de carbono. Estas levaduras se pueden mantener, sin inconvenientes, a altas densidades celulares cuando son cultivadas en fermentadores de gran volumen. Además, poseen la capacidad de introducir muchas de las



modificaciones post traduccionales llevadas a cabo por las células eucariotas superiores como por ejemplo digestiones proteolíticas, plegamiento de proteínas, formación de puentes disulfuro y glicosilación.

*Pichia pastoris* es una de las doce especies dentro de los cuatro géneros de levaduras capaces de metabolizar el metanol como única fuente de carbono (Cregg, J.M. y col. *Bio/Technology* 11:905-910, 1993). Los restantes géneros están representados por *Candida*, *Hansenula* y *Torulopsis*.

Estas levaduras comparten un único repertorio de enzimas correspondientes a la vía metabólica del metanol (Veenhuis, M. y col. *Adv. Microb. Physiol.* 24:1-82, 1983). La primer etapa de esta ruta metabólica es la oxidación de metanol a formaldehído, generando peróxido de hidrógeno por la acción de la enzima alcohol oxidasa (AOX).

La célula evita la toxicidad del peróxido de hidrógeno llevando a cabo esta primer reacción del metabolismo del metanol en una organela especial denominada peroxisoma.

Existen dos genes en *P. pastoris* que codifican para dos enzimas alcohol oxidasa I y II, los genes AOX1 y AOX2. El gen AOX1 es responsable de la mayor parte de la actividad de la alcohol oxidasa en la célula (Cregg, J.M. y col. *Mol. Cell. Biol.* 9:1316-1323, 1989.)





La expresión de este gen esta altamente regulada y es inducida por el metanol llegando a representar AOX1 el 30 % de las proteínas totales solubles de la célula. Por este motivo los sistemas de expresión mas utilizados en *Pichia pasotirs* incluyen en sus vectores al promotor del gen AOX1.

Thomas Kjeldsen y colaboradores compararon la expresión de la proinsulina y péptidos precursores de insulina del tipo (B<sub>1-29</sub> - Ala-Ala-Lys - A<sub>1-21</sub>) en *S. cereviciae* y en *P. pastoris*. Los productos fueron secretados al medio de cultivo a través de una secuencia de aminoácidos fusionada al extremo amino terminal del precursor denominada líder. Para determinar la eficiencia de secreción del precursor de insulina se emplearon distintos péptidos señales tales como el pre-pro-péptido  $\alpha$  maiting factor de *Saccharomyces cerevisiae* y derivados sintéticos del mismo. Estos pre pro péptidos poseen secuencias de aminoácidos que sirven de blanco para la acción de proteasas específicas que permiten la liberación del péptido al medio de cultivo. Todos los propéptidos de insulina utilizados por estos autores se liberaban al medio como un precursor carente de treonina en la posición 30 de la cadena B. Este producto recuperado y purificado del medio de cultivo debió ser sometido a un exhaustivo procedimiento denominado transpeptidación. La



transpeptidación consiste en la adición de la treonina y está descrito por Markussen y col. en la patente US. 4.916.212. La transpeptidación incorpora una etapa adicional al proceso de purificación de la molécula de insulina.

En función de solucionar los problemas aquí planteados, los inventores han obtenido una cepa de levadura que produce y libera al medio un precursor de insulina en cantidades adecuadas para su utilización industrial, donde la nueva cepa comprende dos diferentes construcciones de ADN que conducen la expresión de un gen que codifica para un precursor de insulina. Dicho gen está clonado de manera tal que se libera al medio un precursor de insulina que contiene en su extremo amino terminal al primer aminoácido correspondiente a la insulina, evitándose de esta manera las etapas de eliminación de los aminoácidos remanentes provenientes del péptido señal. Además, la presente invención provee un precursor de insulina que se libera al medio como un precursor que contiene treonina en la posición 30 de la cadena B, evitándose de esta manera la engorrosa etapa de transpeptidación.

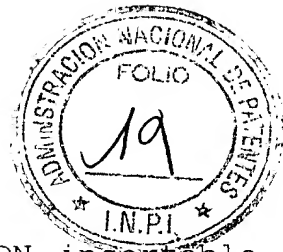


## BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención provee una cepa de levadura metilotrófica recombinante productora de un precursor de insulina humana, donde dicha cepa de levaduras comprende en su genoma por lo menos una copia de una primera construcción de ADN y una segunda construcción de ADN, donde dichas construcciones de ADN son capaces de dirigir la expresión y liberación al medio de un precursor de insulina humana, donde dichas construcciones de ADN comprenden por lo menos una secuencia de ADN que codifica para un precursor de la insulina humana o para un análogo de un precursor de la insulina humana.

Las construcciones de ADN son capaces de dirigir, preferentemente, la expresión de un precursor de la insulina humana de la fórmula: B(1-30)-Y1-Y2-A(1-21), donde Y1 es lisina o arginina; Y2 es lisina o arginina; B(1-30) es el péptido B de la insulina humana; y A(1-21) es el péptido A de la insulina humana.

La cepa de levaduras de la invención es una cepa de levadura de *Pichia pastoris* depositada el 25 de Julio del 2000 en el American Type Culture Collection (ATCC) bajo el número PTA-2260, dicha cepa de levaduras comprende en su genoma una primera construcción de ADN, donde dicha construcción comprende:



a) una primera secuencia de ADN insertable la cual es la región 5' regulatoria del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida operablemente a

b) la secuencia señal MF  $\alpha$  de *Sacharomyces cerevisiae* unida operablemente a

c) una secuencia que codifica para un precursor de la insulina humana, siendo preferentemente un precursor de la fórmula B(1-30)-Y1-Y2-A(1-21) unida operablemente a

d) la secuencia 3' de finalización de la transcripción del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida a

e) un gen de selección HIS4 de *Pichia pastoris* unido a

f) una segunda secuencia de inserción que corresponde al extremo 3' del gen AOX1 de *Pichia pastoris*; y,

una segunda construcción de ADN que comprende:

a) una primera secuencia de ADN insertable la cual es la región 5' regulatoria del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida operablemente a .

b) la secuencia señal MF  $\alpha$  de *Sacharomyces cerevisiae* unida operablemente a

c) una secuencia que codifica para un precursor de la insulina humana, siendo preferentemente el



precursor de la insulina humana de la fórmula B(1-30)-Y1-Y2-A(1-21) unida operablemente a

d) la secuencia 3' de finalización de la transcripción del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida a

e) el gen de selección de resistencia a la zeocina

En otra realización preferida se provee una primera construcción de ADN que comprende por lo menos un cassette de expresión para la expresión de un precursor de insulina humana, donde dicho cassette comprende:

a) una región 5' regulatoria operablemente unida a

b) una secuencia de ADN que codifica para una secuencia señal unida operablemente a

c) una secuencia que codifica a un precursor de la insulina humana unida operablemente a

d) una secuencia funcional de finalización de la transcripción.

La primera construcción de ADN de la invención comprende además en los extremos 5' y 3' secuencias lo suficientemente homólogas con un gen diana de la levadura para permitir la integración específica de reemplazo de la construcción de ADN en el gen diana. Estas secuencias 5' y 3' homólogas a un gen diana se



22

encuentran como secuencias flanqueantes del cassette de expresión.

En otra realización preferida la primera construcción de ADN comprende:

a) una primera secuencia de ADN insertable la cual es la región 5' regulatoria del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida operablemente a

b) la secuencia señal MF  $\alpha$  de *Sacharomyces cerevisiae* unida operablemente a

c) una secuencia que codifica un precursor de la insulina humana, preferentemente codifica al precursor de la insulina humana de la fórmula B(1-30)-Y1-Y2-A(1-21) unida operablemente a

d) la secuencia 3' de finalización de la transcripción del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida a

e) el gen de selección HIS4 de *Pichia pastoris* unido a

f) una segunda secuencia de inserción que corresponde a la secuencia 3' del gen AOX1 de *Pichia pastoris*

En otra realización la presente invención comprende una segunda construcción de ADN, donde dicha



segunda construcción de ADN comprende por lo menos un cassette de expresión para la expresión del precursor de insulina humana, donde dicho cassette comprende:

- a. una región 5' regulatoria operablemente unida a
- b. una secuencia de ADN que codifica para una secuencia señal unida operablemente a
- c. una secuencia que codifica un precursor de la insulina humana unida operablemente a
- d. una secuencia funcional de finalización de la transcripción.

En una realización preferida la segunda construcción de ADN comprende un gen marcador de selección distinto del gen marcador de selección de la primera construcción de ADN de la invención, permitiendo de esta manera una segunda selección de la cepa de levaduras transformadas de la presente invención.

En una realización preferida la segunda construcción de ADN comprende una secuencia única suficientemente homóloga con un gen diana de la levadura para permitir la inserción de la construcción de ADN en un evento simple en un gen diana.

En otra realización preferida la segunda construcción de ADN de la invención comprende:



24

- a. una primera secuencia de ADN insertable que corresponde a la región 5' regulatoria del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida operablemente a
- b. la secuencia señal de MF  $\alpha$  de *Sacharomyces cerevisiae* unida operablemente a
- c. una secuencia que codifica para un precursor de la insulina humana, preferentemente codifica al precursor de la insulina humana de la fórmula B(1-30)-Y1-Y2-A(1-21) unida operablemente a
- d. la secuencia 3' de finalización de la transcripción del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida a
- e. el gen de selección de resistencia a la zeocina

En ambas construcciones de ADN de la invención la secuencia que codifica al precursor de la insulina humana está clonada en dichas construcciones a continuación del sitio de corte de proteasas, donde la totalidad del precursor de insulina humana liberado al medio contiene al aminoácido fenilalanina en su extremo amino terminal.

Cada una de las construcciones de ADN de la invención están incorporada a un vector diferente, donde dicho vector está en la forma circular o lineal.

La presente invención también provee un procedimiento para obtener una cepa de levadura





metilotrónica transformada, productora de elevadas cantidades de un precursor de insulina humana, donde dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

I) transformar una célula de levadura con una primera construcción de ADN, donde dicha construcción comprende

a. una primera secuencia de ADN insertable que corresponde a la región 5' regulatoria del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida operablemente a

b. la secuencia señal MF  $\alpha$  de *Sacharomyces cerevisiae* unida operablemente a

c. una secuencia que codifica para un precursor de la insulina humana, preferentemente codifica el precursor de la insulina humana de la fórmula B(1-30)-Y1-Y2-A(1-21) unida operablemente a

d. la secuencia 3' de finalización de la transcripción del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida a

e. el gen de selección HIS4 de *Pichia pastoris* unido a

f. una segunda secuencia de inserción que corresponde al extremo 3' del gen AOX1 de *Pichia pastoris*

II) seleccionar las células de levaduras

III) aislar una cepa de levadura



IV) retransformar la cepa de levaduras obtenida en las etapas I a III con una segunda construcción de ADN, donde dicha construcción de ADN comprende

a. una primera secuencia de ADN insertable que corresponde a la región 5' regulatoria del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida operablemente a

b. la secuencia señal MF  $\alpha$  de *Sacharomyces cerevisiae* unida operablemente a

c. una secuencia que codifica para un precursor de la insulina humana, preferentemente codifica al precursor de la insulina humana de la fórmula B(1-30)-Y1-Y2-A(1-21) unida operablemente a

d. la secuencia 3' de finalización de la transcripción del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida a

e. el gen de selección de resistencia a la zeocina

V) seleccionar la cepa de levadura retransformada

VI) aislar la cepa de levadura retransformada

#### BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1: La Figura 1 muestra el mapa de restricción del plásmido pPIC9-Ib.

Figura 2: La Figura 2 muestra el mapa de restricción del plásmido pPICZ $\alpha$ A-Ib



27

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

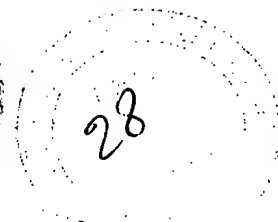
A menos que se definan de otra manera los términos técnicos y científicos utilizados en la presente solicitud tienen el mismo significado que es comúnmente entendido por los expertos en el arte al cual esta invención pertenece. Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la presente solicitud han sido incorporadas aquí exclusivamente como referencias.

Definiciones: el término "precursor de insulina humana" o "proinsulina" tal como se emplea aquí se refiere a cualquier precursor o análogos de precursores de insulina humana que den origen a una molécula de insulina o moléculas relacionadas que muestren la misma actividad biológica de la insulina.

Se entiende por "actividad biológica" a la actividad biológica asociada a la insulina evaluada por ensayos conocidos por los expertos en el arte.

Tal como se emplean aquí los precursores de insulina incluyen a las variaciones alélicas de los precursores de insulina y los derivados obtenidos por simples modificaciones de la secuencia de aminoácidos del producto insulina.

Tal como se emplea aquí "secuencias líder" o "secuencias señal" son expresiones intercambiables y se



refieren a secuencias de aminoácidos que realizan el transporte de un péptido unido a ellas a través de la membrana celular.

Tal como se utiliza aquí "una construcción de ADN" abarca un cassette de expresión y además otras secuencias de ADN.

En función de resolver los problemas antes mencionados los inventores de la presente solicitud han desarrollado una novedosa cepa de levaduras que expresa elevadas cantidades de una molécula de proinsulina humana. Esta cepa de levaduras ha sido obtenida por un procedimiento novedoso, donde se transforman y retransforman secuencialmente las levaduras con dos diferentes y novedosas construcciones de ADN. La proinsulina secretada al medio por la nueva cepa es un precursor de insulina, dicho precursor es preferentemente un precursor cuyo péptido C ha sido reemplazado por una secuencia de dos aminoácidos y donde la purificación del mismo para obtener insulina humana activa genera escasos contaminantes, evitándose las etapas de transpeptización sin disminuir los rendimientos industrialmente requeridos. Además, dichas construcciones de ADN han sido clonadas de manera tal que se evita la etapa de eliminación de los



aminoácidos remanentes del péptido señal de la proinsulina secretada.

Utilizando la cepa y las construcciones de ADN de la presente invención se obtienen niveles de producción del precursor de insulina humana de entre 200 a 400 mg/litro de fermentación, considerados como muy adecuados para la producción industrial.

La cadena codificante del gen del precursor de la insulina humana se obtuvo por síntesis empleando la reacción en cadena de la polimerasa

La metodología de síntesis de genes tiene la ventaja de ser rápida y de permitir la elección de los codones mas utilizados por el huésped de expresión seleccionado.

Este procedimiento consistió en la síntesis química de un conjunto de oligonucleótidos que componen la secuencia entera de ambas cadenas del ADN de los precursores seleccionados. Posteriormente se llevó a cabo la ligación de los pares de oligonucleótidos complementarios. Para evitar los problemas asociados con eventos de hibridización cruzada entre los oligonucleótidos, se utilizó un método de PCR que permitió completar el procedimiento en un solo día.



30

La primera etapa consistió en la producción de un templado central. Se emplearon oligonucleótidos que se localizan en el centro de la secuencia a ser construida siendo complementarios uno con el otro en sus extremos 3'. Este apareamiento posee una  $T_m$  específica para cada par de oligonucleótidos.

Posteriormente, se realizó la elongación por PCR y se relleno cada fragmento a partir del extremo 3', obteniéndose finalmente una doble cadena completa.

Una alícuota de la mezcla de PCR se utilizó en un segundo evento de PCR luego de la adición de los cebadores correspondientes.

Se continuó posteriormente el procedimiento con pares de cebadores adecuados hasta obtener el producto final.

Una vez obtenidos los fragmentos de ADN que codifican al precursor de insulina humana, los mismos fueron incorporados al vector pPIC9 (Invitro). Una vez que ambas entidades fueron ligadas se caracterizó el vector recombinante en ensayos con enzimas de restricción. Algunos de los vectores recombinantes, tomados al azar fueron secuenciados según el método de Sanger empleando el Kit Sequenace V 2.0. Los cebadores utilizados para la secuenciación de la hebra 5'-3' fueron 5' AOX1 y Factor  $\alpha$  y para la hebra 3'-5' se utilizó el cebador 3' AOX1, ambos



31

provistos por Invitrogen. Los resultados de la secuenciación corroboraron, en el vector, que la secuencia de la proinsulina era la correcta.

Al nuevo vector formado se lo denominó pPIC9-Ib.  
(Figura 1)

El vector fue digerido con una enzima de restricción dando origen a dos fragmentos de ADN, el fragmento que contenía a la construcción de ADN de la invención fue el utilizado para transformar a las levaduras metilotróficas. Dicha construcción de ADN comprende un promotor que responde al metanol correspondiente al gen AOX I de las levaduras metilotróficas; una secuencia de ADN que codifica para una secuencia señal; un gen de un precursor de la insulina humana; la secuencia señal de la finalización de la transcripción y el gen HIS4 que codifica para la histidinol dehidrogenasa todos contenidos entre los extremos 5' y 3' del gen AOX I.

En la presente invención se pueden utilizar para transformar levaduras cualquier vector lineal o circular de interacción sitio específica sin alterar el sentido de la misma.

En la construcción de ADN de la invención se puede utilizar cualquier secuencia señal que permita exportar apropiadamente al precursor de insulina. Preferentemente se

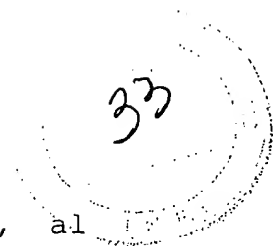


32

puede utilizar la secuencia señal de la MF  $\alpha$  de *S. Cerevisiae* que es un péptido compuesto por 13 residuos de aminoácidos. La secuencia señal de la MF $\alpha$  posee un sitio de corte para proteasas determinado por la secuencia de aminoácidos Lys-Arg-Glu-Ala. Durante el proceso de clonado en pPIC9 del gen de un precursor de insulina este puede ser preferentemente insertado en el sitio Xho I que elimina a los residuos -Glu-Ala- quedando de esta manera el comienzo del inserto del gen de un precursor de insulina inmediatamente a continuación del sitio de remoción de proteasas (Figura 1). El clonado en el sitio Xho I permite obtener un precursor liberado al medio de cultivo carente de aminoácidos remanentes, simplificando de esta manera las etapas de purificación de la insulina humana.

Existen en las levaduras diversos genes respondedores al metanol. La expresión de cada uno de estos genes está controlada por regiones 5' regulatorias respondedoras al metanol conocidas como promotores. Cualquiera de tales secuencias 5' regulatorias son adecuadas para utilizarse como promotores en la construcción de ADN de la invención. Los ejemplos de regiones regulatorias, incluyen pero no están limitadas al promotor del gen primario de la enzima alcohol oxidasa de *Pichia pastoris* (AOX1), al promotor del gen secundario de la enzima alcohol oxidasa II (AOX2), al promotor del gen de





la dihidroxiacetona sintetaza (DAS) de *P. Pastoris*, al promotor del gen P40 de *P. Pastoris*, al promotor del gen de la catalasa de *P. Pastoris*, y al promotor GAP de la gliceraldehído P dehidrogenasa. Preferentemente se puede emplear al promotor del gen primario de la enzima alcohol oxidasa de *Pichia pastoris* (AOX 1) por ser este altamente eficiente para proveer elevados niveles de expresión génica. Resulta evidente para cualquier experto en el arte que cualquiera sea la elección del promotor o las regiones regulatorias caen dentro de la presente invención, pudiéndose utilizar preferentemente las regiones 5' regulatorias que tienen la capacidad de responder a un medio que contiene metanol.

Las secuencias 3' de terminación de la construcción de ADN de la presente invención son aptas para finalizar, poliadenilar y estabilizar el ARNm codificado por el gen de del precursor de insulina. Se pueden utilizar secuencias de terminación características de las familias de levaduras metilotróficas, preferentemente secuencias 3' de terminación de *Pichia pastoris*.

La construcción de ADN también contiene un gen de un marcador seleccionable. Para estos propósitos se puede emplear cualquier gen marcador de selección que sea funcional en levaduras metilotróficas que incluye pero no está limitado a cualquier gen que le confiera a la levadura



metilotrófica un fenotipo seleccionable que permita seleccionar positivamente a las levaduras transformadas con la construcción de ADN de la invención. Es un marcador apropiado cualquier sistema que utilice una cepa huésped de *P. Pastoris* mutante auxotrófica y el gen de tipo biosintético salvaje que complementa el defectos del huésped. Preferentemente se puede utilizar al gen HIS4 que codifica para la histidinol dehidrogenasa y la cepa mutante auxotrófica.

La construcción de ADN de la invención utilizada para transformar levaduras metilotróficas tiene la característica de insertarse en el genoma de la levadura huésped por recombinación homóloga con los extremos 5' y 3' del gen endógeno AOX 1 de la levadura, donde dicho gen endógeno es reemplazado por la construcción de ADN de la invención.

La construcción de ADN de la invención puede ser insertada en cualquier vector funcional en bacterias (vector quimérico), donde los vectores incluyan marcadores de selección y sitios de replicación adecuados para bacterias. Estos vectores pueden encontrarse bajo la forma circular formando plásmidos de replicación extracromosomal dentro de la bacteria. Múltiples copias de la construcción de ADN de la invención podrían encontrarse incorporadas a dicho vector.



Las construcciones de ADN de la invención se utilizan para transformar levaduras metilotróficas de acuerdo con cualquier método estándar de transformación de levaduras. Ejemplos de métodos de transformación incluyen pero no están limitados a electroporación, producción de esferoplastos, transformación con cloruro de litio y transformación con PEG 1000, preferentemente se pueden utilizar los métodos de producción de esferoplastos y de electroporación. La transformación con la construcción de ADN se puede llevar a cabo con la construcción de ADN dispuesta en forma lineal o circular. La construcción de ADN está dirigida al gen blanco del genoma de la levadura por secuencias flanqueantes que tienen una homología suficiente con el gen blanco para que la construcción de ADN se integre al sitio al cual fue dirigida. En una realización preferida por lo menos una copia de la construcción de ADN de la invención se integra al genoma del huésped en la orientación correcta.

Es posible emplear cualquier cepa de levaduras metilotróficas. Ejemplos de levaduras metilotróficas incluyen pero no están limitados a los géneros *Pichia*, *Torulopsis*, *Hansenula* y *Candida*, preferentemente se puede



36

utilizar la cepa de *Pichia pastoris* GS115 (APEC N° 20864) que posee el gen HIS4 mutado y por lo tanto es HIS<sup>-</sup>.

De todos los transformantes que son His<sup>+</sup> la integración de la construcción de ADN de la invención reemplazando al gen estructural AOX 1 del genoma de la cepa GS115 ocurre con una frecuencia de alrededor del 5 al 35%. El evento de reemplazo del gen estructural AOX 1 del genoma de la levadura genera levaduras denominadas Mut<sup>s</sup>, que son sensibles a la utilización de metanol como fuente de carbono. Cualquier experto en el arte puede entender que la construcción de ADN de la invención puede también integrarse por alguno de sus extremos 5' o 3' dentro del gen AOX 1 generando levaduras Mut<sup>r</sup> que son resistentes a la utilización de metanol como fuente de carbono debido a que conservan al gen AOX 1 funcional; la construcción de ADN podría también integrarse al genoma de la levadura por recombinación con el gen His de la levadura cuya secuencia también se encuentra en la construcción de ADN de la invención o la construcción de ADN podría integrarse en varios sitios del genoma de la levadura sin limitar el alcance de la invención.

Posteriormente, los clones transformados con la construcción de ADN de la invención son seleccionados por cualquier método conocido en el arte, preferentemente se realizan experimentos de réplica en placas que permitan



34

distinguir a los clones His<sup>+</sup> Mut<sup>r</sup> y His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup>. Alternativamente, se pueden seleccionar los clones productores empleando técnicas inmunoquímicas.

Cada uno de los clones Mut<sup>s</sup> y Mut<sup>r</sup> seleccionados por los métodos antes mencionados fueron sub clonados y aislados como clones puros. De todos los clones seleccionados se eligieron aquellos que producían cantidades adecuadas del precursor de insulina. Se los caracterizó y se analizó el número de copias de la construcción de ADN de la invención. Se detectaron varios clones que producían cantidades adecuadas del precursor de insulina, siendo algunos de ellos Mut<sup>s</sup> y otros Mut<sup>r</sup>.

Dos de estos clones fueron empleado para someterlos a un segundo evento de transformación denominado aquí también como retransformación.

En otra realización de la invención la secuencia de nucleótidos que codifica a un precursor de insulina fue amplificada por PCR, aislada y clonada en el vector pPICZαA en el sitio de multiclonado especialmente diseñado, obteniéndose un vector denominado pPICZαA-Ib (Figura.2). Dicha vector contiene una nueva construcción de ADN (segunda construcción de ADN) que comprende un promotor que responde al metanol del gen AOX 1 de las levaduras metalotróficas; una secuencia de ADN que codifica una



38

secuencia señal, el gen de un precursor de la insulina, una secuencia señal de finalización de la transcripción y un gen de selección diferente al utilizados en la primera construcción de ADN de la invención.

Se puede utilizar cualquier secuencia señal que permita apropiadamente la secreción del precursor de insulina. Ejemplos de secuencias señales incluyen pero no están limitados a las secuencias señal de MF $\alpha$  del *S. Cerevisiae* y la secuencia señal de fosfatasa alcalina, preferentemente se puede utilizar la secuencia señal de la MF  $\alpha$  del *S. Cerevisiae* que corresponde a un péptido de 13 residuos de aminoácidos. Durante el proceso de clonado del gen que codifica al precursor de insulina en el plásmido pPICZ $\alpha$ A dicho gen se insertó en el sitio Xho I que elimina a los residuos -Glu-Ala- quedando de esta manera el comienzo del gen de un precursor de insulina inmediatamente a continuación del sitio de remoción de proteasas. Este diseño de clonado permite que el precursor liberado al medio de cultivo se encuentre carente de aminoácidos remanentes del péptido señal, evitando una etapa en la secuencia de purificación de la insulina humana.

Cualquier secuencia 5' regulatoria es adecuada para utilizarse como promotor en la segunda construcción de ADN de la invención. Los ejemplos de regiones regulatorias, incluyen pero no están limitadas al promotor del gen



29

primario de la enzima alcohol oxidasa de *Pichia pastoris* (AOX I), al promotor del gen secundario de la enzima alcohol oxidasa II (AOX II), al promotor del gen de la dihidroxiacetona sintetasa (DAS) de *P. Pastoris*, al promotor del gen P40 de *P. Pastoris*, al promotor del gen de la catalasa de *P. Pastoris* y a al promotor GAP del gen de la gliceraldehído dehidrogenasa. Preferentemente se puede emplear al promotor del gen primario de la enzima alcohol oxidasa de *Pichia pastoris* (AOX 1) por ser este altamente eficiente para proveer elevados niveles de expresión génica. Resulta evidente para cualquier experto en el arte que cualquier elección del promotor o las regiones regulatorias adecuadas caen dentro de la presente invención. Se pueden utilizar preferentemente las regiones 5' regulatorias que son capaces de responder a un medio que contiene metanol.

Las secuencias 3' de terminación de la segunda construcción de ADN de la presente invención son aptas para finalizar, poliadenilar y estabilizar el ARNm codificado por el gen del precursor de insulina. Se pueden utilizar secuencias de terminación características de las familias de levaduras metilotróficas, preferentemente secuencias 3' de terminación de *Pichia pastoris*.



La segunda construcción de ADN de la invención también contiene un gen de un marcador seleccionable. Para estos propósitos se puede emplear cualquier gen marcador de selección que sea funcional en levaduras metilotróficas pero diferente del utilizado en la transformación anterior, preferentemente se puede utilizar al gen de la zeocina que codifica resistencia al antibiótico zeocina.

El nuevo vector para la retransformación de las levaduras puede comprender una única copia o múltiples copias de la segunda construcción de ADN de la invención. Cualquier método para la obtención de un vector con múltiples copias puede ser empleado, preferentemente se puede emplear un método que comprenda una estrategia de clonado de multímeros, generándose un vector con múltiples copias de la segunda construcción de ADN de la invención, preferentemente que contenga entre 2 y 18 copias de dicha construcción de ADN.

Los nuevos vectores recombinantes aislados se caracterizaron mediante el análisis con enzimas de restricción. Los vectores recombinantes fueron secuenciados y se corroboró la correcta posición dentro del vector de la secuencia que codifica al precursor de insulina y al péptido señal; y se corroboró el número de copias del gen de interés.





Los nuevos vectores se utilizaron para la retransformación de las levaduras. Se pueden emplear vectores que contengan entre 1 y 18 copias del gen de un precursor de insulina. Preferentemente se puede utilizar un vector que contenga una única copia de la segunda construcción de ADN de la invención. Dicho vector recombinante puede ser linearizado por digestión con una enzima de restricción o puede ser utilizado en la forma circular para retransformar las células de levaduras. Preferentemente se utiliza al vector linearizado para la realización del segundo evento de transformación en los clones Mut<sup>s</sup> obtenidos en la etapa de transformación anterior.

Cualquier método conocido en el arte para la transformación de levaduras puede ser utilizado en la retransformación, que incluye pero no está limitado a formación de esferoplastos, electroporación, transformación con PEG 1000 y transformación con cloruro de litio. Preferentemente se puede utilizar un método seleccionado entre el método de transformación de esferoplastos y electroporación.

Cualquier experto en el arte puede entender que para la realización del segundo evento de transformación se pueden emplear vectores con una o múltiples copias del gen de interés y donde dicha etapa de retransformación se puede



42

realizar empleando cualquier método de transformación de levaduras sin alterar el alcance de la presente solicitud.

El vector linearizado con la construcción de ADN de la invención utilizado para retransformar los clones de levaduras metilotróficas productores del precursor de insulina puede tener preferentemente la característica de insertarse al genoma del huésped en un único sitio, generando posteriormente *in vivo* múltiples copias genómicas

Los clones retransformados fueron adecuadamente seleccionados empleando cualquiera de los métodos conocidos para realizar dobles selecciones de levaduras, preferentemente se puede emplear una doble selección en un medio carente de histidina y con zeocina.

Los clones positivos seleccionados se aislaron, purificaron; y se caracterizaron las secuencias integradas al genoma de las levaduras. La presencia en el ADN total de los clones de levaduras retransformados de las construcciones de ADN de la presente invención se determinaron empleando el método de Southern blot y mediante un análisis genómico por PCR. El número de copias de la construcción de ADN de la invención presente en el genoma de las levaduras se determinó empleando el método conocido como Dot Blot y mediante el método de análisis del número de copias por PCR.



De todos los clones caracterizados se seleccionó preferentemente al clon B1,3.3 depositado el 25 de Julio del 2000 en el American Type Culture Collection (ATCC) bajo el número de depósito.PTA-2260 que contenía una copia de la primera construcción de ADN de la invención y 13 copias de la segunda construcción de ADN de la invención, donde dicho clon es es Mut<sup>s</sup>, es resistente a la zeocina y puede crecer en un medio libre de histidina.

Se aislaron otros clones productores con las siguientes características: clon C1,46: de fenotipo Mut<sup>r</sup> donde la integración de la primera construcción de ADN de la invención fue en el gen His de la levadura, conteniendo 5 copias de la construcción de ADN y donde dicho clon fue sometido a un único evento de transformación; clon C2,7: de fenotipo Mut<sup>s</sup>, conteniendo una única copia de la construcción de ADN y donde dicho clon fue sometido a un único evento de transformación; Clon 25: de fenotipo Mut<sup>r</sup>, conteniendo 6 copias de la construcción de ADN, la integración de la construcción fue en el gen AOX 1 de la levadura y donde dicho clon fue sometido a un único evento de transformación; Clon V8,10.1: de fenotipo Muts con 8 copias generadas *in vitro* de la segunda construcción de ADN de la invención y donde dicho clon surge luego de un evento de retransformación de un clon que contiene por lo menos una copia de la primera construcción de ADN.



Todas le cepas transformadas y ~~retransformadas~~ seleccionadas por presentar los rasgos fenotípicos y geneotípicos deseados fueron cultivadas en frascos erlenmeyers. Las colonias y cepas que resultaron de interés se seleccionaron para ser cultivadas en fermentadores.

Para la producción a gran escala de los precursores de insulina se utilizaron los métodos y procedimientos típicos para levaduras metilotróficas, preferentemente las fermentaciones se realizaron cultivando en una primera etapa las cepas de levadura en un medio con exceso de una fuente de carbono no inductora como glicerol. En esta etapa la expresión de las construcciones de la invención con el gen que codifica a un precursor de la insulina humana está totalmente reprimida, generándose una importante biomasa sin producción del gen de interés. Posteriormente a este período de crecimiento se hicieron crecer las células preferentemente bajo condiciones limitantes de metanol con o sin otra fuente de carbono para inducir la expresión del gen de interés contenido en las construcciones de ADN de la invención. Dichas construcciones de ADN fueron capaces de conducir la expresión del gen que codifica un precursor de la insulina humana en respuesta al metanol y fueron capaces de liberar al medio de cultivo significativas cantidades del precursor, en cantidades suficientes y adecuadas para su empleo a escala industrial.



Esta invención se encuentra mejor ilustrada según los siguientes ejemplos, los cuales no deben ser interpretados como una limitación impuesta al alcance de la misma. Por el contrario, debe entenderse claramente que puede recurrirse a otras realizaciones, modificaciones y equivalentes de la misma que luego de leerse la presente descripción, puede sugerir a aquellos entendidos en el tema sin apartarse del espíritu de la presente invención y/o alcance de las reivindicaciones anexas.

#### EJEMPLOS

##### Ejemplo 1.

##### Construcción del precursor de insulina

Se realizó la construcción de un precursor de insulina mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando codones humanos:

Las condiciones de PCR fueron llevadas a cabo de acuerdo a lo detallado por ( *A Method for Synthesizing Genes and cDNAs by Polymerase Chain Reaction*. Di Donato, Alberto y col. *Analytical Biochemistry*. 212:291-293; 1993), modificando las temperaturas de anillado (templado) de acuerdo a las T<sub>m</sub> de cada oligonucleótido.

##### Cebadores:

SEQ ID: N°1: 5'-TCACACCTGG TGGAAGCTCT CTACCTAGTG



TGCGGG -3'

SEQ ID: N°2: 5'-GGTCTTGGGT GTGTAGAAGA AGCCTCGTTC

CCCGCACACT AGGTA-3'

SEQ ID: N° 3: 5'- TTTGTGAACC AACACCTGTG CGGCTCACAC  
CTGGTGGAA -3'

SEQ ID: N°4: 5'-GCTGGTACAG CATTGTTCCA CAATGCCACG

CTTGGTCTTG GGTGT -3'

SEQ ID: N° 5: 5'-CTAGTTGCAG TAGTTCTCCA GCTGGTAGAG

GGAGCAGATG CTGGTACAGC A T-3'

#### Producto final:

SEQ ID: N° 8: 5'- TTTGTGAACC AACACCTGTG CGGCTCACAC  
CTGGTGGAAAG CTCTCTACCT AGTGTGCGGG GAACGAGGCT TCTTCTACAC  
ACCCAAGACC AAGCGTGGCA TTGTGGAACA ATGCTGTACC AGCATCTGCT  
CCCTCTACCA GCTGGAGAAC TACTGCAACT AG -3'

(precursor de insulina completo)

#### Ejemplo 2

Construcción de un precursor de insulina mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los codones mas utilizados por *Pichia pastoris*.

#### Cebadores:

SEQ ID: N° 9: 5'-ACTTGGTTGA AGCTTTGTAC TTGGTTTGTG  
GTGAAAGAGG TTTCTTCTAC-3'



47

SEQ ID N° 10: 5'-AGAAGTACAA CATTGTTCAA CGATACCTCT  
CTTAGTCTTT GGAGTGTAGA -3'

SEQ ID:N° 11: 5'-ACACTTGTGT GGTTCCTCACT TGGTTGAAGC  
TTT-3'

SEQ ID:N° 12: 5'- TTACTCGAGT TAGTTACAGT AGTTTTCCAA  
TTGGTACAAA GAACAGATAG AAGTACAACA TTGTTC -3'

SEQ ID: N° 13: 5'-CCGCTCGAGA AGAGATTTGT TAACCAACAC  
TTGTGT -3'

El producto obtenido contiene la siguiente  
secuencia:

SEQ ID: N° 14:

5'-TTTGTTAACC AACACTTGTG TGGTTCTCAC TTGGTTGAAG  
CTTTGTACTT GGTTTGTGGT GAAAGAGGTT TCTTCTACAC TCCAAAGACT  
AAGAGAGGTA TCGTTGAACA ATGTTGTACT TCTATCTGTT CTTTGTACCA  
ATTGGAAAAC TACTGTAACCT AA-3'

Las condiciones de PCR fueron idénticas a las del  
Ejemplo 1.

1- La veintava parte del producto obtenido en cada  
PCR fue utilizado como templado para el evento siguiente.

2- El producto de la PCR final fue purificado por  
una columna microspin S300 (Amersham) y digerido con la  
enzima de restricción Xho I.



El producto de la digestión fue ligado ~~con~~ en el vector pPIC9 previamente digerido con la misma enzima de restricción.

3- Para la detección de clones recombinantes y la correcta orientación del inserto se realizó una digestión con la enzima de restricción Hpa I.

### Ejemplo 3

Construcción del Factor  $\alpha$  con los codones de mayor uso en *Pichia pastoris*

Se clonó por esta misma técnica la secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia líder o péptido señal.

Los cebadores empleados fueron:

5'-CGCGGATCCA AACCATGAGA TTCCCATCTA TCTTCACTGC  
TGTTTTGTTC GCTGCT -3'

5'- GTTTTGTTCG CTGCTTCTTC TGCTTTGGCT GCTCCTGTTA  
ACACTACTAC TGAAGACGAA ACTGCTCA-3'

5'-ACGTCGAAGT CACCTTCCAA GTCAGAGTAA CCGATAACCG  
CTTCAGCTGG GATTTGAGCA GTTTCGTCTT C -3'





5'-GATGAACAAC AAACCATTAT TAGTAGAGTT AGAGAAAGGC  
AAAACAGCAA CGTCGAAGTC ACCTTC -3'

5'-CCGCTCGAGA GAAACACCCT CTCCTTAGC AGCGATAGAA  
GCGATAGTAG TGTGATGAA CAACAAACCA TT -3'

El producto final tiene la secuencia:

SEQ ID N° 20

5'-ATGAGATTCC CATCTATCTT CACTGCTGTT TTGTTGCTG  
CTTCTTCTGC TTTGGCTGCT CCTGTAAACA CTACTACTGA AGACGAAACT  
GCTCAAATCC CAGCTGAAGC GGTTATCGGT TACTCTGACT TGGAAGGTGA  
CTTCGACGTT GCTGTTTTGC CTTTCTCTAA CTCTACTAAT AATGGTTTGT  
TGTTTCATCAA CACTACTATC GCTTCTATCG CTGCTAAGGA AGAGGGTGTT  
TCTCTCGAGA AGAGAGAGGC TGAAGCA-3'

El clonado del MF $\alpha$  y el precursor de insulina con  
codones de mayor uso en *Pichia pastoris*:

1- Se reemplazó el péptido señal de pPIC9 por  
péptido señal con codones de *Pichia pastoris*. Se  
digirió pPIC9 con las enzimas de restricción BamHI y  
XhoI



2- Se separó en gel de agarosa al 0,8% los fragmentos digeridos y se recuperó del fragmento de 7780 bp.

3- Se digirió el producto de PCR SEQ ID: N° 20 con las mismas enzimas de restricción utilizadas en 1 y se ligó con el fragmento extraído en 2.

4- Se digirió el vector obtenido en 3 y el fragmento de PCR SEQ ID N° 14 con la enzima de restricción XhoI, y posteriormente se ligó.

5- Se detectaron los recombinantes con la correcta orientación del inserto del precursor de insulina unido con la enzima de restricción HpaI.

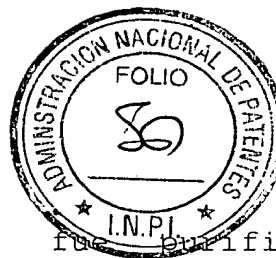
#### Ejemplo 4:

Clonado del gen del precursor de insulina en el vector de levaduras pPIC9

Se amplificó el fragmento de ADN que codifica al precursor de insulina mediante PCR, utilizando como templado a la SEQ N° 8 obtenida previamente y como cebadores a las siguientes secuencias:

SEQ N°15. 5' - GGGGATQCAT ATGCTCGAGA AAAGATTTGT  
GAACCAACAC CT GT-3'.

SEQ N°16. 5' - TTAGAATTCC CGGGTCTAGT TGCAGTAGTT CT  
-3'.



El producto de PCR obtenido fue purificado empleando el Kit DNA Clean Up System (Promega) y de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se transformó a la cepa JM-109 de *E. coli* con el vector pPIC9.

Posteriormente, se extrajo el ADN plasmídico mediante el uso del kit Wizard plus miniprep DNA purification system (Promega).

Se digirieron vector e inserto con las enzimas de restricción Xho I y Eco RI y se ligaron ambas moléculas según protocolos convencionales).

Se utilizó 5  $\mu$ l del producto de ligación para transformar a 100  $\mu$ l de bacterias competentes correspondientes a la cepa de *E. coli*. JM-109 según protocolos convencionales.

Se extrajo el ADN de las colonias resistentes a ampicilina por el método descripto precedentemente.

200 ng de ADN de cada muestra fueron digeridos con 5 U de la enzima de restricción Alw NI o con 5 U de las enzimas Xho I y Eco RI.

Las colonias conteniendo los plásmidos recombinantes fueron crecidas y el ADN plasmídico fue extraído y purificado.

Posteriormente se secuenció el ADN del plásmido. Los cebadores utilizados en la secuenciación de la hebra 5'



- 3' fueron: 5' AOX1 y  $\alpha$ -Factor. La hebra 3' 5' fue secuenciada con el cebador 3' AOX1 (secuencias provistas por el Kit de Invitrogen, denominadas 3'AOX1, 5'AOX1 y  $\alpha$ -Factor).

El ADN requerido para estas secuenciaciones fue purificado a partir de un Kit miniprep SV (promega). Se emplearon entre 3 - 5  $\mu$ g de ADN por secuenciación y el protocolo empleado es el sugerido por el Kit de Amersham.

**Ejemplo 5: Estrategia de clonado del precursor de insulina en el vector de levaduras pPICZ $\alpha$ A.**

En el ejemplo se muestra la clonación en pPICZ $\alpha$ A de una copia del gen que codifica al precursor de insulina humana.

El vector escogido es el pPICZ $\alpha$ A cuyo mapa general se muestra en la Figura 2. Este vector posee 2 sitios de corte para la enzima de restricción XhoI, un sitio ubicado en el sitio de múltiples cortes para enzimas de restricción (1185) y el otro en la posición 1247. La enzima XhoI se utilizó para digerir el vector y clonar el gen de interés según el siguiente protocolo:

PICZ $\alpha$ A	10 $\mu$ l ( $\cong$ 2 $\mu$ g)
buffer Neb2 (10 X)	4 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	23,6 $\mu$ l



53

BSA (100 X)

Xho I

2 µl (40 U)

La digestión se llevó a cabo a 37°C durante 6 hs.

40 µl del producto de la digestión se pasaron por una columna microspin HR S-200 (Amersham)

Posteriormente, se realizó la desfosfatación con fosfatasa alcalina intestinal o CIP según el siguiente protocolo:

PICZαA (digerido)	40 µl
buffer NebCIP(10X)	5 µl
H <sub>2</sub> O	4 µl
CIP	1 µl

La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos. Finalmente, la reacción se detuvo por calor (75°C, 10 minutos) y se purificó el ADN pasando la muestra por una columna microspin HR S-400.

#### Preparación del inserto

El precursor de insulina fue amplificado por PCR utilizando las mismas condiciones, empleadas en el ejemplo 4 correspondiente al clonado de esta secuencia en el vector pPIC9, con los cebadores:

SEQ ID: N° 15: 5'- GGGGATCCAT ATGCTCGAGA AAAGATTTGT  
GAACCAACAC CTGT-3'



SEQ ID: N° 17: 5'-TCACTCGAGC GGTCTAGTTG  
CAGTAGTTCT-3'

Los 50  $\mu$ l del producto de PCR fueron purificados por una columna microspin HR S-200. Se los digirió durante 6 horas de acuerdo al siguiente protocolo:

Productos de PCR	40 $\mu$ l ( $\cong$ 600 ng)
buffer Neb2 (10 X)	5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	3 $\mu$ l
BSA (100 X)	0,5 $\mu$ l
Xho I	1,5 $\mu$ l (40 U)

La digestión se detuvo con calor (65°C, 20 minutos) y los productos de la digestión se purificaron por columna microspin HR S-200.

Para ligar el fragmento correspondiente al precursor de insulina con el vector pPICZ $\alpha$ A se llevó a cabo el siguiente protocolo:

El vector y el inserto, fueron digeridos con Xho I y nuevamente cuantificados para hacer la ligación. La ligación se llevó a cabo con 100 ng de vector en cada



55

evento, utilizándose las siguientes relaciones molares vector/inserto 1:1, 1:3, 1:6 y 1:0 (control negativo).

Se transformó con 5  $\mu$ l de cada una de las relaciones anteriores bacterias *E. coli* de la cepa Top 10 (Invitrogen).

En la placa correspondiente a la relación 1:3 se obtuvieron 13 colonias vs 6 colonias en el control negativo. Se picaron las 13 colonias en tubos con 1,5 ml de medio LB para hacer minipreps convencionales.

Los ADNs obtenidos fueron digeridos con la enzima de restricción AlwNI para determinar el número y orientación de los recombinantes obtenidos.

Se obtuvieron 7 colonias recombinantes, 2 en la orientación correcta, obteniéndose el vector pPICZ $\alpha$ A Ib (Figura 2).

Se utilizó el ADN de una de las colonias para transformar a la cepa TOP10.

#### Ejemplo 6:

**Estrategia de clonado de multímeros del precursor de insulina humana un vector de levaduras**

En el ejemplo se describe la obtención de un multicassette conteniendo múltiples copias del gen que codifica al precursor de insulina en el vector pPICZ $\alpha$ A Ib obtenido en el ejemplo 5.



El procedimiento seguido para obtener la construcción con dos copias del gen de interés es el descrito a continuación como protocolo de generación de multímeros *in vitro* de acuerdo con las instrucciones detalladas provistas por el fabricante (Invitrogen)

Se realizaron dos digestiones:

Digestión 1: pPICZ $\alpha$ A Ib con Bam HI

Digestión 2: pPICZ $\alpha$ A Ib con Bam HI y Bgl II.

Se recuperó el cassette de expresión a partir de un gel de agarosa.

Se ligó el cassette Bgl II-BamHI conteniendo una copia del gen del precursor de insulina con el producto de la digestión 1 y se transformaron bacterias de *E. Coli* Top10.

Se extrajo el ADN plasmídico y se analizó por mapeo de restricción la presencia de recombinantes.

A partir del mapeo de restricción con Bgl II y Bam HI se pudieron diferenciar los dos tipos de configuraciones. Se seleccionaron para continuar el procedimiento aquellas que se presentaban en tándem directo. Mediante este procedimiento se generó un vector denominado pPICZ $\alpha$ A Ib2 con los extremos Bgl II y Bam HI compatibles para la ligación, pero que al ser ligados ambos sitios se destruyen.





El protocolo de generación de multímeros *in vitro* fue nuevamente empleado reemplazando al vector pPICZαA Ib por el vector pPICZαA Ib2, obteniéndose así el vector pPICZαA Ib4 (vector con las 4 copias del gen en tándem directo).

Finalmente, se generó un vector pPICZαA Ib8 a partir del anterior protocolo reemplazando al vector pPICZαA Ib por el vector pPICZαA Ib4.

Para la obtención del cassette BglIII-BamHI se digirieron 4 µg de DNA con ambas enzimas a la vez a 37°C, durante toda la noche. Luego, se corrió un gel con 0,8% de agarosa (Promega). De esta forma se separó el cassette con los multímeros del resto del vector. Para purificar el fragmento de ADN de la agarosa se escindió la banda correspondiente del gel y se la purificó según protocolo del Kit Clean-up de Promega.

Los clones recombinantes siempre se detectaron con la enzima AlwNI.

#### Ejemplo 7:

##### Transformación de Levaduras:

La cepa elegida para la transformación fue *Pichia pastoris* GS115 (*His4*) (Invitrogen).

El procedimiento de transformación se realizó de acuerdo con los protocolos del Manual de Instrucciones



58

(Pichia Expression Kit; Version G 161219, 25-0043)  
provisto por Invitrogen.

**Procedimiento de transformación a través de esferoplastos:** Para cada evento de transformación se utilizaron 100 ul de la preparación de esferoplastos (descrita por Invitrogen) a la que se le adicionó 10 ug de ADN (pPIC9-Ib). Se incubó durante 10 minutos a T° ambiente. Durante el transcurso de la incubación se preparó 1 ml de una solución 1:1 PEG/CaT que fue adicionada a la solución de células y ADN. Se homogeneizó y se incubó durante 10 minutos a T° ambiente.

Luego de una etapa de centrifugación a 750 x g durante 10 minutos se resuspendió el pellet celular en 150 ul de medio SOS y se dejó durante 20 minutos a T° ambiente.

Se adicionaron 850 ul de 1M de sorbitol y se procedió al plaqueado de las células con agarosa.

Se mezclaron diversos volúmenes (100 a 300 ul) de esferoplastos transformados con 10 ml de RD molten agarosa que se vertieron sobre placas conteniendo medio RDB. Cada muestra fue realizada por duplicado.

Las placas fueron incubadas a 28 - 30 °C durante 4 - 6 días. Se tomaron muestras y se determinó la viabilidad celular cultivando las células de levadura en un medio RDHB que contiene histidina.



59

### Ejemplo 8:

#### Selección y aislamiento de las levaduras recombinantes

Las transformaciones de las levaduras de la cepa *Pichia pastoris* GS115 con el vector pPIC9 digerido con *Bgl* II favorecen la recombinación en el locus *AOX I*. El reemplazo del gen estructural alcohol oxidasa (*AOX I*) ocurre con una frecuencia del 5 - 35% de los transformantes  $\text{His}^+$ .

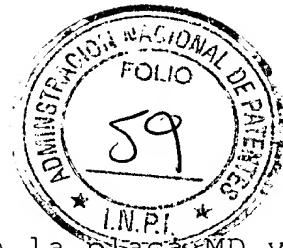
Mediante un experimento de replica en placa sobre un medio mínimo conteniendo dextrosa (MD) y medio mínimo conteniendo metanol (MM) se pueden distinguir transformantes  $\text{Mut}^+$  y  $\text{Mut}^s$ .

Las colonias  $\text{His}^+$  provenientes de la transformación del ejemplo 7 fueron seleccionadas de acuerdo con el siguiente protocolo:

Cada colonia fue tomada con una punta estéril y se lo deslizó para hacer una marca o estría sobre una placa MM y luego sobre una placa MD.

En función de diferenciar a ambos fenotipos se incluyeron los controles correspondientes a GS115/ $\text{His}^+$   $\text{Mut}^+$  y GS115/ $\text{His}^+$   $\text{Mut}^s$  (Invitrogen).

Las placas se incubaron a 30°C durante 48 - 72 horas. Este método permitió distinguir a los clones  $\text{Mut}^s$



como aquellos que crecieron normalmente en la placa MD y no crecieron en la placa MM.

Cada uno de los clones Mut<sup>s</sup> o Mut<sup>r</sup> seleccionados por este método fueron purificados y se aislaron clones puros. El aislamiento se realizó efectuando estrías de cada colonia en un medio mínimo sin Histidina.

#### Ejemplo 9:

**Retransformación de los clones de levaduras obtenidos en el ejemplo 8.**

La retransformación de los clones se llevó a cabo empleando el método de transformación por electroporación de acuerdo al protocolo sugerido por Invitrogen. En la transformación el ADN utilizado correspondió a 20 µg del plásmido pPICZαA Ib.

#### Ejemplo 10:

**Identificación y aislamiento de colonias productoras del precursor de insulina retransformadas según el ejemplo 9**

Una vez finalizada la retransformación se reveló la presencia de clones productores del precursor de insulina mediante un método inmunoquímico.

Alícuotas de 50 a 600 µl de células transformadas fueron esparcidas en placas conteniendo medio YPDS ágar con 100µg/ml Zeocina.



61

Una vez que las colonias resistentes a Zeocina crecieron se procedió a detectar la presencia del precursor de insulina de acuerdo con el siguiente esquema:

Se colocó sobre cada placa a analizar una membrana de nitrocelulosa de manera tal que se contactara con cada una de las colonias, y se la depositó en forma invertida sobre placas de cultivo que contenían medio BMMY/agarosa.

Se incubaron las placas con los filtros adheridos durante 24 horas a 30°C.

Luego, se retiran las membranas y se las sometió a una serie de lavados con una solución de PBS/0,05% a 0,1% de Tween-20 durante 1 hora con regulares cambios de medio.

Las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con un 5% de leche descremada en PBS/0.1% Tween -20 durante 1 hora a 4°C.

Luego, se incubaron las membranas con un anticuerpo policlonal de cobayo anti-insulina humana; durante 1 hora a T° ambiente, y se lavaron con una solución de PBS/0.1% Tween-20 durante 30 minutos.

Posteriormente los filtros fueron incubados con un anticuerpo policlonal anti IgG, de cobayo conjugado con peroxidasa durante 1 hora a T° ambiente y se lavaron con una solución de PBS/0.1% Tween-20 durante 30 minutos. Finalmente se reveló la presencia de peroxidasa con una



solución 0,012% de  $H_2O_2$ ; 0,08% de DAB; 100mM de Tris/ClH a pH 7,5.

Las colonias que resultaron positivas fueron identificadas y aisladas de la placa original.

En base a la comparación de las intensidades de la reacción se seleccionaron los clones altamente productores.

#### **Ejemplo 11:**

##### **Expresión de los clones recombinantes**

Para determinar la capacidad de producción de las colonias seleccionadas se realizaron experimentos de crecimiento e inducción con medio BMGY/BMMY. El primer medio de cultivo contiene glicerol que es la fuente de carbono utilizada por el microorganismo para producir biomasa. El segundo de los medios contiene metanol que es el inductor del promotor AOXI.

Las colonias fueron crecidas en frascos de erlenmeyer en medio BMGY a 30°C hasta alcanzar una  $OD_{600nm}$  : 6 - 20. Posteriormente las células fueron centrifugadas para reemplazar el medio de cultivo por BMMY en un volumen correspondiente a la quinta parte del utilizado en la fase de crecimiento. El cultivo prosiguió durante 120 horas a partir del cambio de medio a una temperatura de 30°C y con agitación. Cada 24 horas se adicionó un 0,5% v/v de metanol al 100% y se sacaron muestras para ser evaluadas por



63

electroforesis en gel de poliacrilamida Tris/Tricina al 15%. Cada muestra fue centrifugada para remover las células y el sobrenadante fue tratado con un buffer muestra de acuerdo a protocolos establecidos por Laemmli, (Laemmli, U.K. Nature 227:680-685; 1970).

A partir de los resultados de los geles de poliacrilamida se eligieron aquellos clones capaces de secretar un péptido con una movilidad electroforética coincidente a la del precursor de insulina de un PM de entre 5.800 a 5.900.

Los clones seleccionados mostraron tener una muy alta expresión de la proteína. Posteriormente se realizó la caracterización molecular del genoma de los clones productores.

#### Ejemplo 12:

##### Caracterización molecular de los clones recombinantes

La extracción de ADN de *Pichia pastoris* se realizó de acuerdo con el método sugerido por la guía de Invitogen.

##### Análisis por Southern Blot

Se utilizaron los procedimientos estándar de separación en geles de fragmentos de ADN previamente digeridos con enzimas de restricción y su posterior



transferencia e hibridización con sondas específicas de acuerdo con protocolos estándar.

Brevemente, se utilizó la sonda AOX que es un fragmento de 871 pb del promotor de AOX1 obtenido a partir de la digestión del vector pPICZαA con las enzimas BglII y HindI; y la sonda His que es un fragmento de 1587 pb del gen HIS4 obtenido por digestión del vector pPIC9 con la enzima MscI; y la sonda Ins que es un fragmento de 227 pb obtenido por PCR usando como templado el plásmido pPIC9IB y los cebadores correspondientes a las SEQ ID: 15 y 16.

El ADN cromosómico fue digerido con la enzima BglII.

En los filtros hibridizados con la sonda AOX se observó la banda de alrededor de 1600 pb correspondiente al gen AOX1 endógeno, tanto en la levadura sin transformar GS115 como en los demás clones del tipo Mut<sup>r</sup>. En cambio esta banda no apareció en los clones transformados Mut<sup>s</sup>. En todos los clones transformantes se observó una banda de 5700 pb correspondiente al cassette de expresión del precursor de insulina bajo el promotor AOX1 y el gen HIS4, provenientes de la transformación, con pPIC9-Ib digerido con BglII, con distinta intensidad dependiendo esto del número de copias incorporadas. En algunos clones se observaron otras bandas de distintos tamaños pudiendo corresponder por ejemplo a la pérdida de los sitios BglII por cortes





exonucleolíticos previos a la inserción en el cromosoma. En los clones provenientes de la retransformación del clon C2,7 con pPICZ $\alpha$ A-Ib (clon B1,3.3) (linearizado con SacI) se observó, además de la banda de 5,7 kpb, una banda de 3,8 kpb correspondiente a la inserción del cassette de del precursor de insulina bajo el promotor AOX1 y el gen de zeocina.

Análisis detallado de cada clon hibridizado con la sonda AOX

*Pichia pastoris* GS115: banda esperada de 1,6 kpb

Clon 25: bandas esperadas de 1,6 y 5,7 kpb.

Clon C1,46: banda esperadas de 1,6 y 5,7 kpb mas 3 bandas de 7,8; 7,3 y 4,8 kpb.

Clon C2,7: banda esperada de 5,7 kpb .Ausente la banda de 1,6 kpb, indicando que es un transformante del tipo Mut<sup>S</sup>.

Clon B1,3.3: banda de 5,7 kb (inserción de C2,7) más banda de 3,8 kpb correspondiente a la inserción del cassette de pPICZ $\alpha$ AIb (linealizado con SacI)

Los mismos filtros utilizados con la sonda AOX fueron rehibridizados con la sonda HIS. Se observó una banda de 2,7 kpb correspondiente al gen HIS4 endógeno tanto en la levadura sin transformar, GS115, como en la mayoría de los clones transformantes. Esta banda no apareció en el



clon C1,46 indicando en este caso que hubo una integración a nivel de este gen perdiéndose los sitios BglII del mismo. En todos los clones transformantes se observó una banda de 5700 pb correspondiente al cassette del precursor de insulina bajo el promotor AOX1 y el gen HIS4, provenientes de la transformación con pPIC9-Ib digerido con BglII, con distinta intensidad dependiendo esto del número de copias incorporado. En algunos clones se observaron otras bandas de distintos tamaños pudiendo corresponder por ejemplo a la pérdida de los sitios BglII por cortes exonucleolíticos previos a la inserción en el cromosoma.

A través del análisis de los southern blots hibridados con HIS se individualizó un clon con una sola copia del cassette de expresión el cual fue tomado como patrón para determinar posteriormente el número de copias en los otros clones.

A través de la hibridación de las membranas con la sonda de insulina se corroboró que todas las bandas obtenidas al hibridizar con las sondas AOX y HIS, con excepción de las correspondientes a los genes endógenos, contienen el gen correspondiente al precursor de insulina.



### Análisis por la técnica de Dot blot

Para determinar el número de copias de la secuencia del precursor de insulina de los distintos clones transformantes se empleó la técnica de dot blot hibridizando con las sondas Ins y Gap. La sonda Gap se empleó como patrón de gen de copia única presente en todos los clones. A partir de la relación entre las señales obtenidas con ambas sondas y teniendo como referencia un clon de copia única de insulina (obtenido del análisis de southern blot), se determinó el número de copias de insulina.

El número de copias del gen que codifica al precursor de insulina en cada clon fue el siguiente:

Clon 25: 6

Clon C1,46: 6

Clon C2,7: 1

Clon B1,3.3: 13

Clon V8,10.1: 8

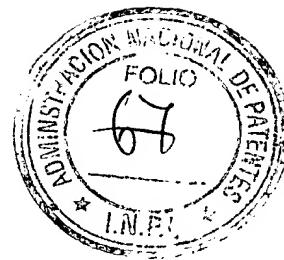
### Caracterización de colonias Mut<sup>s</sup> o Mut<sup>r</sup> por PCR:

Se utilizó un protocolo de acuerdo con el siguiente esquema:

ADN cromosómico: 10-20 ng

5' AOX 0,5 µM

3' AOX IN 0,5 µM



68

dNTP 0,2 mM

Cl<sub>2</sub>Mg 1,5 mM

Taq: 2U

Buffer 10X 1x

Secuencia de los cebadores:

5'AOX I: 5'- GACTGGTTCC AATTGACAAG C

3'AOX IN: 5'- GTCGTGGTTT CTCATAGTAG AGTGGACA

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: Desnaturalización 94°C 2 minutos. 1 ciclo

25 ciclos:

Desnaturalización 94°C, 1 min.

Anillado 55, 1 min.

Extensión 72°C, 1 min.

Extensión Final: 72°C, 7 min. 1 ciclo

En los clones Mutr aparece una banda de 730 pares de bases En los clones Muts no se observa banda.

**Cuantificación del número de copias del gen del precursor de insulina por PCR en las colonias recombinantes**

Se extrajo el ADN de todas las muestras y se normalizó las cantidades mediante una PCR con cebadores GAP (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, gen de copia única).

Se realizó una nueva PCR con cebadores específicos para insulina de acuerdo a la cuantificación anterior



utilizando concentraciones crecientes de templeado para cada punto. De este modo se evitó la saturación de la señal.

El producto de la PCR se analizó en un gel al 2% de agarosa y luego de teñir con bromuro de etidio se visualizaron las bandas con un equipo de captura de imágenes Fotodyne. La cuantificación se lleva a cabo con un software ImageQuant.

Se tomó como unidad al clon C2,7 que presenta una única copia del gen del precursor de insulina y los restantes se comparan de acuerdo a la intensidad de los productos de la PCR.

Para garantizar que las condiciones experimentales de las amplificaciones de los genes GAP e insulina fueran equivalentes se diseñaron cebadores con una T° de hibridación semejante y con productos de tamaños similares.

Cebadores GAP:

Gap5': 5' GGT CAT CAC TGC TCC ATC

Gap3': 5' AGC AGC ACC AGT GGA AGA T

Condiciones de la PCR:

desnaturalización: 94°C, 3 minutos

24 ciclos de:

94°C, 1 minuto

56°C, 1 minuto

72°C, 30 segundos



ADN cromosómico: 0,5 - 1,5 ng

Cebador Gap 5': 0,5  $\mu$ M

Gap 3': 0,5  $\mu$ M

dNTP: 0,2 mM

ClMg: 1,5 mM

Taq Pol: 2,5 U

buffer 10x: 1 x

Las condiciones para el precursor de insulina fueron iguales a las antes descriptas con cebadores específicos.

Cebadores del precursor de insulina:

SEQ ID: N° 15: 5'- GGGGATCCAT ATGCTCGAGA AAAGATTTGT  
GAACCAACAC CTGT

SEQ ID: N° 17: 5'- TCACTCGAGC GGTCTAGTTG CAGTAGTTCT

Los resultados de los experimentos de Dot Blot y PCR cuantitativa fueron equivalentes, es decir por ambas metodologías se encontró el mismo número de copias de los recombinates producidos.

### Ejemplo 13: Proceso de fermentación

El desarrollo de la fermentación fue llevado a cabo tanto en un fermentador BioFlo 3000 (New Brunswick Scientific) como en un Biostat II (B. Braun Biotech). Ambos fermentadores están equipados con vasos de 2,5 litros. Sin



embargo el procedimiento de fermentación es adaptable a mayores volúmenes mediante el escalado del protocolo.

#### Preparación del cultivo

El precultivo para inocular el fermentador se llevó a cabo en Erlenmeyers de 125 ml con 25 ml de medio de cultivo BMGY, el mismo fue inoculado con la cepa correspondiente, partir de muestras congeladas en glicerol 50% a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El cultivo fue incubado a  $30^{\circ}\text{C}$ , 240 r.p.m. durante 14 horas en un agitador orbital.

#### Fermentación

El total de los 25 ml fue transferido al fermentador conteniendo 1,2 l de medio basal BSM mas 4,35 ml /l de sales trazas. La temperatura se controló a  $30^{\circ}\text{C}$ , el oxígeno disuelto a 35%, el pH a 4,5 y la aireación a 1 vvm. El oxígeno disuelto se controló mediante la variación según control PID de la velocidad de agitación y la adición de  $\text{O}_2$ . El pH se controló mediante la adición automática de una solución al 28% de hidróxido de amonio.

Luego de aproximadamente 16 horas de cultivo, se finalizó la fase de cultivo en lote o cuando la densidad óptica llegó a un valor cercano a 20 unidades de absorbancia a 600 nm.



42

Se inició la fase de lote alimentado al fermentador mediante la adición de glicerol 50% mas 12 ml/l de sales trazas. La velocidad de adición se reguló a 24 ml/l/h. Esta fase duró aproximadamente 20 horas, alcanzándose valores de densidad óptica de 300.

Una vez finalizadas las fases de crecimiento de la biomasa, se dejó en hambreado a las células durante media hora y se comenzó la fase de producción. Durante dicha fase se reguló el pH entre 3.5 y 5.5, y se alimentó con metanol al 100% mas 12 ml/l de sales trazas, a una velocidad de 1,2 ml/l/h. Esta última fase se puede extender hasta 96 horas. Se pueden realizar variaciones en la elección del tiempo adecuado para agregar metanol al cultivo, en la concentración de metanol y en la inclusión de una alimentación mixta glicerol/metanol para mejorar aun más el proceso de producción.

Finalizada esta etapa se dio por concluido el proceso y se comenzó con la etapa de separación de las células del caldo de cultivo. Cuando el proceso de fermentación se realizó con grandes volúmenes se utilizaron métodos de separación acordes.

La implementación de este protocolo de fermentación en 1 y 100 litros permitió obtener entre 200 y 400 mg de precursor de insulina/Litro de fermentación de acuerdo a la cantidad de metanol utilizado en la inducción.





El sobrenadante resultó apto para ser introducido en la primera etapa de purificación del precursor de insulina.

#### Ejemplo 14:

#### Purificación de Insulina Humana recombinante

##### Captura del precursor

La recuperación del precursor de insulina recombinante humana del medio de cultivo se realizó mediante una cromatografía de intercambio catiónico por ejemplo SP sepharose Fast Flow (Pharmacia) (Katsoyannis, P. G., y col. *Biochemistry* 6:2642-2655; 1967) u otra técnica cromatografica adsortiva como por ejemplo la de interacción hidrofóbica utilizando una resina Phenyl Sepharose Fast Flow de acuerdo a protocolos descriptos por Gagnon, Pete y col. *Large Scale Process Development for Hydrophobic Interaction Chromatography, Part 1: Gel Selection and Development of Binding Conditions. BioPharm* 8:21-29; 1995.

El buffer de lavado consistió de una solución de acetato de sodio 50 mM, NaCl 50 mM y el buffer de elusión consistió en acetato de sodio 50 mM y NaCl 450 mM. El precursor se mantuvo soluble mediante la adición de etanol o urea



En el procedimiento la columna se equilibró con 3 Vc de buffer de lavado a una velocidad lineal de 100 cm/h. El pegado del producto se realizó a una velocidad lineal de 90 a 120 cm/h. Finalizada esta etapa se realizó un lavado con 4 Vc de buffer de lavado. El producto se eluyó con 10 Vc de Buffer de elusión. El proceso cromatográfico se monitoreó mediante la lectura de la absorbancia a 280 nm. Aquellas fracciones conteniendo el producto de interés fueron reunidas en una única solución.

#### Procesamiento enzimático del precursor de insulina

##### Digestión con tripsina y carboxipeptidasa B

La digestión se llevó a cabo ajustando la concentración de la solución del precursor entre 1 y 20 mg/ml, de acuerdo a lo descrito en la patente europea N° 195691. El transcurso de la reacción se monitoreó mediante HPLC en fase reversa.

La digestión se finalizó con al agregado de ácido acético 7.5 M.

La enzima proteolítica se eliminó del medio de reacción mediante cromatografía de exclusión molecular o intercambio iónico a pH: 2-5. Las fracciones correspondientes al precursor digerido se colectaron en una única solución para su posterior digestión con



carboxipeptidasa B de acuerdo a lo descripto en la patente europea 195691.

Se realizó como método alternativo la adición simultanea de ambas enzimas siguiendo los protocolos descriptos en la patente EPO N° 195691 y en la publicación Lila R. Castellanos-Serra y col. *FEBS Letters* 378: 171-176; 1996.

La purificación final de la insulina obtenida luego de la acción enzimática puede ser llevada a cabo por cualquier técnica cromatográfica como las descriptas en la patente US N° 5.663.291; EPO N° 195691; y las técnicas descriptas en la publicación Kroeff, Eugene y col. *Journal of Chromatography*. 461:45-61; 1989.



## REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

1. Una cepa de levadura metilotrófica recombinante productora de un precursor de insulina humana caracterizada porque comprende en su genoma por lo menos una copia de una primera construcción de ADN y una segunda construcción de ADN, donde dichas construcciones de ADN son capaces de dirigir la expresión y liberación al medio de un precursor de insulina humana, donde dichas construcciones de ADN comprenden por lo menos una secuencia de ADN que codifica para un precursor de la insulina humana.

2. Una cepa de levadura de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque libera al medio un precursor de insulina humana de la fórmula:

B(1-30)-Y1-Y2-A(1-21), donde Y1 es lisina o arginina; Y2 es lisina o arginina; B(1-30) es el péptido B de la insulina humana; y A(1-21) es el péptido A de la insulina humana.



3. Una cepa de levadura de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque la cepa de levadura es un miembro seleccionado del grupo que comprende a los géneros *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* y *Torulopsis*.

4. Una cepa de levadura de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizada porque la cepa de levadura es una cepa de levadura de *Pichia pastoris* depositada en ATCC bajo el número PTA-2260.

5. Una cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque dicha primera construcción de ADN comprende

a) una primera secuencia de ADN insertable que corresponde a una secuencia 5' regulatoria (promotor) unida operablemente a

b) una secuencia señal de exportación unida operablemente a

c) una secuencia que codifica un precursor de la insulina humana unida operablemente a

d) una secuencia 3' de finalización de la transcripción unida a

e) un gen de selección unida a

f) una segunda secuencia de inserción; y  
la segunda construcción de ADN comprende



48

a) una primera secuencia de ADN insertable que corresponde a una región 5' regulatoria (promotor) unida operablemente a

b) una secuencia señal de exportación unida operablemente a

c) una secuencia que codifica para un precursor de la insulina humana unida operablemente a

d) una secuencia 3' de finalización de la transcripción unida a

e) un gen de selección de resistencia diferente del gen de resistencia de la primera construcción de ADN.

6. Una primera construcción de ADN de acuerdo con la reivindicaciones 1 y 5, caracterizada porque comprende por lo menos un cassette de expresión para la expresión del precursor de insulina humana, donde dicho cassette comprende

a) una región 5' regulatoria operablemente unida a

b) una secuencia de ADN que codifica para una secuencia señal unida operablemente a

c) una secuencia que codifica un precursor de la insulina humana unida operablemente a

d) una secuencia funcional de finalización de la transcripción.



7. Una primera construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque el gen marcador de selección es HIS4.

8. Una primera construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque los extremos 5' y 3' de dicha construcción de ADN comprenden secuencias lo suficientemente homólogas con un gen diana de la levadura para permitir la integración específica de reemplazo de la construcción de ADN en el gen diana, en la misma orientación relativa del gen diana en el genoma de la levadura.

9. Una primera construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque la región 5' regulatoria es seleccionada del grupo consistente en el promotor del gen primario de la enzima alcohol oxidasa de *Pichia pastoris* (AOX1), el promotor del gen secundario de la enzima alcohol oxidasa II (AOX2), el promotor del gen de la dihidroxiacetona sintetasa (DAS) de *P. Pastoris*, el promotor del gen P40 de *P. Pastoris*, el promotor del gen de la catalasa de *P. Pastoris*, y el promotor GAP de la gliceraldehído dehidrogenasa.



80

10. Una primera construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque la secuencia señal es MF  $\alpha$  de *Sacharomyces cerevisiae*.

11. Una primera construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque la secuencia funcional de finalización de la transcripción es la secuencia derivada del gen AOX 1 de *Pichia pastoris*.

12. Una primera construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque comprende,

a) una primera secuencia de ADN insertable que corresponde a la región 5' regulatoria del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida operablemente a

b) la secuencia señal MF  $\alpha$  de *Sacharomyces cerevisiae* unida operablemente a

c) la secuencia que codifica para el precursor de la insulina humana de la fórmula B(1-30)-Y1-Y2-A(1-21) unida operablemente a

d) la secuencia 3' de finalización de la transcripción del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida a

e) el gen de selección HIS4 de *Pichia pastoris* unida a

f) una segunda secuencia de inserción que corresponde a la secuencia de finalización del gen AOX1 de *Pichia pastoris*





13. Una primera construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque la secuencia que codifica al precursor de la insulina humana está clonada en dicha construcción a continuación del sitio de corte de proteasas, donde la totalidad del precursor de insulina humana liberado al medio contiene en su extremo amino terminal al primer aminoácido del precursor de insulina humana.

14. Una primera construcción de ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-13, caracterizada porque dicha construcción de ADN está incorporada a un vector seleccionado del grupo de vectores lineales y circulares.

15. Una segunda construcción de ADN de acuerdo con la reivindicaciones 1 y 5, caracterizada porque comprende por lo menos un cassette de expresión para la expresión del precursor de insulina humana, donde dicho cassette comprende

- a) una región 5' regulatoria operablemente unida a
- b) una secuencia de ADN que codifica para una secuencia señal unida operablemente a



82

c) una secuencia que codifica un precursor de la insulina humana unida operablemente a

d) una secuencia funcional de finalización de la transcripción.

16. Una segunda construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque comprende un gen marcador de selección distinto del gen marcador de selección de la primera construcción de ADN, donde dicho marcador de selección es el gen que codifica resistencia a la zeocina y donde dicho marcador de selección permite realizar un segundo evento de selección.

17. Una segunda construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque el extremo 5' insertable de dicha construcción de ADN comprende una secuencia única suficientemente homóloga con un gen diana de la levadura para permitir la inserción de la construcción de ADN en un evento simple en un gen diana.

18. Una segunda construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque la región 5' regulatoria es seleccionada del grupo consistente en el promotor del gen primario de la enzima alcohol oxidasa de *Pichia pastoris* (AOX1), el promotor del gen secundario de



83

la enzima alcohol oxidasa II (AOX2), el promotor del gen de la dihidroxiacetona sintetasa (DAS) de *P. Pastoris*, el promotor del gen P40 de *P. Pastoris*, el promotor del gen de la catalasa de *P. Pastoris*, y el promotor GAP de la gliceraldehído dehidrogenasa.

19. Una segunda construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque la secuencia señal es la secuencia MF  $\alpha$  de *Sacharomyces cerevisiae*.

20. Una segunda construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque la secuencia funcional de finalización de la transcripción es la secuencia derivada del gen AOX 1 de *Pichia pastoris*.

21. Una segunda construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque comprende

a) una primera secuencia de ADN insertable que corresponde a la región 5' regulatoria del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida operablemente a

b) la secuencia señal de MF  $\alpha$  de *Sacharomyces cerevisiae* unida operablemente a

c) la secuencia que codifica para el precursor de la insulina humana de la fórmula B(1-30)-Y1-Y2-A(1-21) unida operablemente a



84

d) la secuencia 3' de finalización del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida a

e) el gen de selección de resistencia a la zeocina

22. Una segunda construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque la secuencia que codifica al precursor de la insulina humana está clonada en dicha construcción a continuación del sitio de corte de proteasas, donde la totalidad del precursor de insulina humana liberado al medio contiene en su extremo amino terminal al primer aminoácido del precursor de insulina humana.

23. Una segunda construcción de ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15-22, caracterizada porque dicha construcción de ADN está incorporada a un vector seleccionado del grupo de vectores lineales y circulares.

24. Un procedimiento para obtener la cepa de levadura de la reivindicación 1, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

I) transformar una célula de levadura con una primera construcción de ADN, donde dicha construcción comprende



85

a) una primera secuencia de ADN insertable que corresponde a la región 5' regulatoria del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida operablemente a

b) la secuencia señal MF  $\alpha$  de *Sacharomyces cerevisiae* unida operablemente a

c) la secuencia que codifica para el precursor de la insulina humana de la fórmula B(1-30)-Y1-Y2-A(1-21) unida operablemente a

d) la secuencia 3' de finalización del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida a

e) el gen de selección HIS4 de *Pichia pastoris* unido a

f) una segunda secuencia de inserción que corresponde a la secuencia de finalización del gen AOX1 de *Pichia pastoris*

II) seleccionar las células de levaduras

III) aislar una cepa de levadura

IV) retransformar la cepa de levaduras obtenida en las etapas I a III con una segunda construcción de ADN, donde dicha construcción de ADN comprende

a) una primera secuencia de ADN insertable que corresponde a la región 5' regulatoria del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida operablemente a

b) la secuencia señal MF  $\alpha$  de *Sacharomyces cerevisiae* unida operablemente a



86

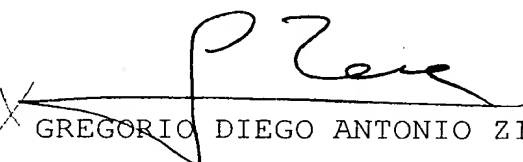
c) la secuencia que codifica para el precursor de la insulina humana de la fórmula B(1-30)-Y1-Y2-A(1-21) unida operablemente a

d) la secuencia 3' de finalización de la transcripción del gen AOX1 de *Pichia pastoris* unida a

e) el gen de selección de resistencia a la zeocina

V) seleccionar la cepa de levadura retransformada

VI) aislar la cepa de levadura retransformada y seleccionada.

  
GREGORIO DIEGO ANTONIO ZIDAR



## RESUMEN

Cepa de levaduras metilotróficas recombinantes productoras de un precursor de insulina, construcciones de ADN y método para obtener la cepa. Dicha cepa comprende en su genoma por lo menos una copia de una primera construcción de ADN y una segunda construcción de ADN, donde dichas construcciones de ADN son capaces de dirigir la expresión y liberación al medio de un precursor de insulina humana de la fórmula: B(1-30)-Y1-Y2-A(1-21), donde Y1 es lisina o arginina; Y2 es lisina o arginina; B(1-30) es el péptido B de la insulina humana; y A(1-21) es el péptido A de la insulina humana y donde la cepa de levaduras corresponde a una cepa de levadura de *Pichia pastoris*.

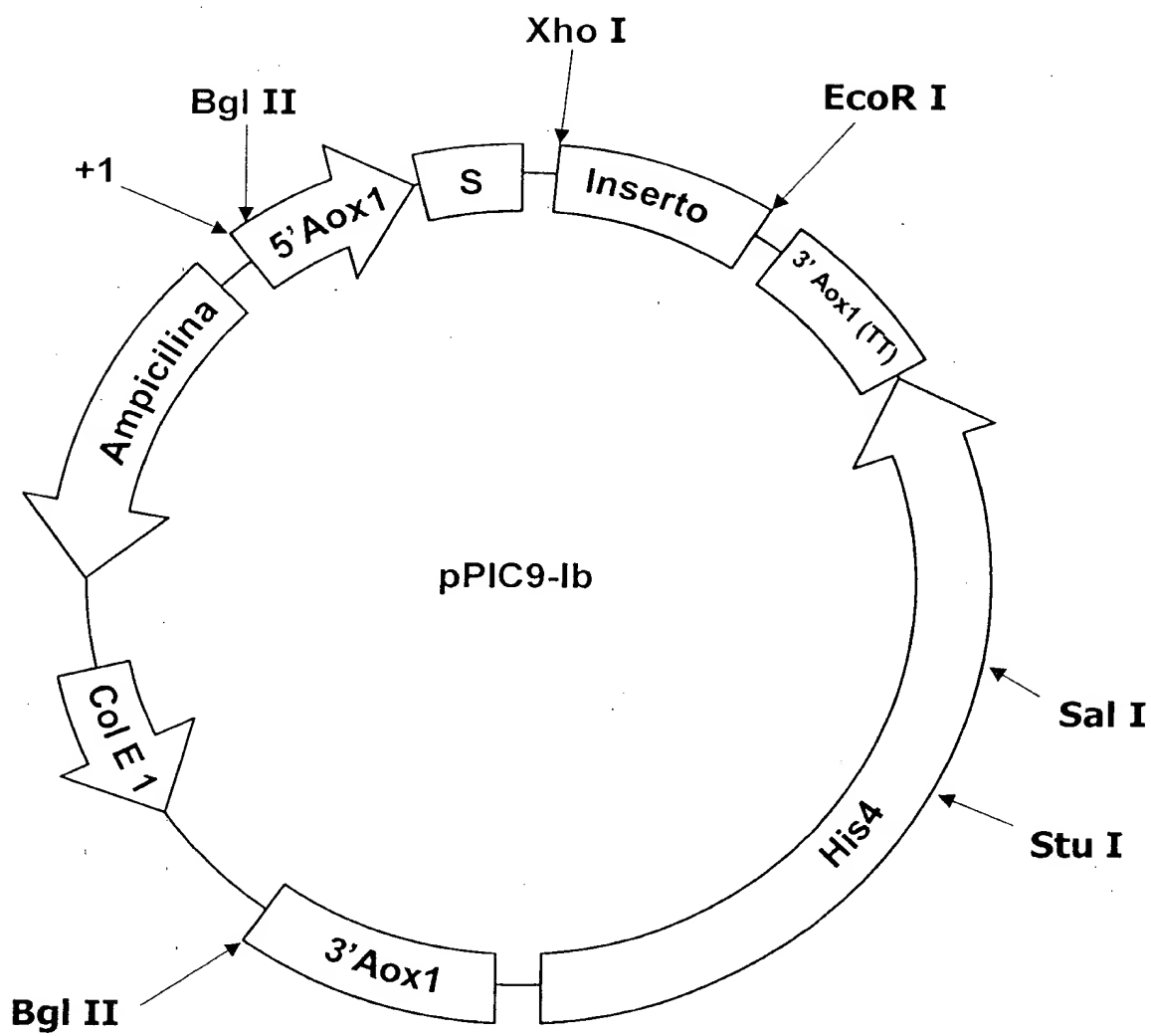


Fig. 1



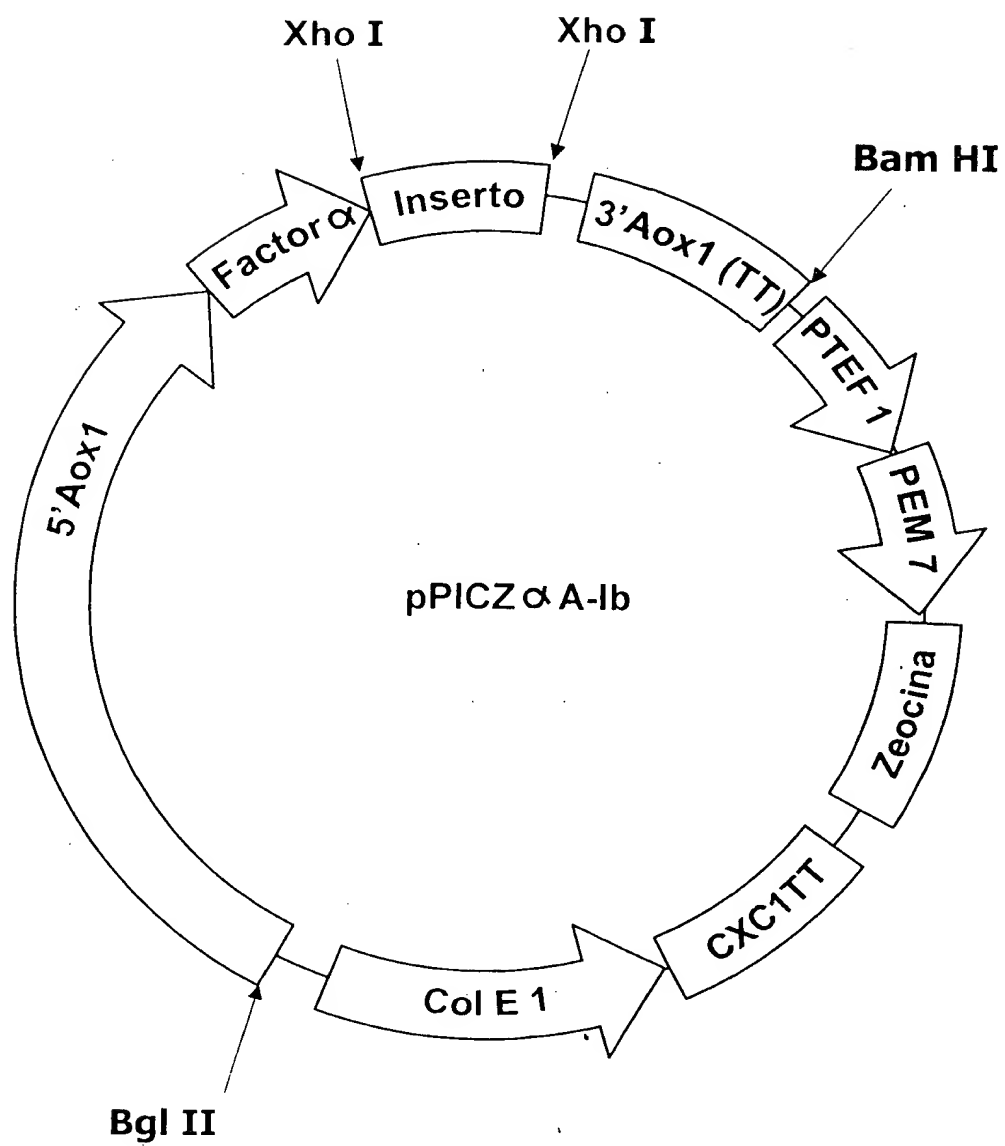


Fig. 2